
Signaltransduktion, spezifische Hemmung und biotechnologische Nutzung des humanen TSLP-Rezeptors

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Darmstadt zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation vorgelegt von Dipl.-Ing.(FH) Andreas Wohlmann aus Gera
April 2014 — Darmstadt — D 17



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Fachbereich Chemie
Allgemeine Biochemie

Signaltransduktion, spezifische Hemmung und biotechnologische Nutzung des humanen TSLP-Rezeptors

Genehmigte Dissertation von Dipl.-Ing.(FH) Andreas Wohlmann aus Gera

Referent: Prof. Dr. Harald Kolmar

Korreferent: Prof. Dr. Karlheinz Friedrich

Tag der Einreichung: #29.April.2014

Tag der mündlichen Prüfung: #18.Juni.2014

Darmstadt — D 17

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Harald Kolmar im Fachgebiet Biochemie des Fachbereiches Chemie der Technischen Universität Darmstadt, sowie im Institut für Biochemie II des Universitätsklinikums Jena von Februar 2009 bis April 2014 angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Zytokin Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) als neue Zielstruktur bei der Behandlung pathophysiologischer Prozesse	2
1.2	Die Signaltransduktion des TSLP-Rezeptors	7
1.3	Ansätze zur Beeinflussung von zytokinvermittelten pathophysiologischen Prozessen am Beispiel TSLP-induzierter Entzündungsprozesse	10
1.4	Zielsetzung	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Bakterienstämme und Medien	13
2.1.2	Eukaryotische Zellen und Medien	13
2.1.3	Zytokine	14
2.1.4	Plasmide	14
2.1.5	Primer	15
2.1.6	Antikörper	16
2.1.7	Chemikalien / Feinchemikalien / Kits	17
2.1.8	Geräte und Materialien	19
2.2	Molekularbiologische Methoden	20
2.2.1	Herstellung chemokompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	20
2.2.2	Transformation von kompetenten <i>Escherichia coli</i> -Zellen	20
2.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> -Zellen	20
2.2.4	Bestimmung der DNA-Konzentration	21
2.2.5	Restriktion von Plasmiden	21
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.2.7	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	21
2.2.8	Ligation	21
2.2.9	PCR-Techniken	22
2.2.10	DNA-Sequenzierung	22
2.3	Zellbiologische Methoden	23
2.3.1	Kultivierung und Passagierung von Zellen	23
2.3.2	Inkulturnahme und Kryokonservierung von Zellen	23
2.3.3	Bestimmung der Zellzahl einer Kultur	24
2.3.4	Stimulation von Zellen für Western Blots	24

2.3.5	Transiente Transfektion von Zellen	24
2.3.6	Stabile Transfektion von Rezeptorketten	24
2.3.7	Einfacher und Dualer Luciferase-Reporterassay	25
2.3.8	Proliferationsassay	26
2.3.9	Zell-ELISA	26
2.3.10	Zytometrische Oberflächen-Analyse (FACS - <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>)	26
2.3.11	Bakteriendisplay	27
2.3.12	Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) aus Vollblut . . .	29
2.3.13	Isolierung von Monozyten aus PBMCs, Generierung von dendritischen Zellen	29
2.4	Proteinbiochemische Methoden	29
2.4.1	Zelllyse	29
2.4.2	Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford	30
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.4.4	Western Blotting	31
2.4.5	Immunodetektion	31
2.4.6	Entfernung gebundener Antikörper von der Blotmembran (Strippen der Membran mit β -Mercaptoethanol)	31
2.4.7	Immunpräzipitation	31
2.4.8	Silberfärbung	32
2.4.9	ELISA	32
2.4.10	Rekombinante Herstellung des TSLP	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Die Signaltransduktion des humanen TSLP-Rezeptors	35
3.1.1	Untersuchungen zur intrazellulären Signalweiterleitung des humanen TSLP-Rezeptors	35
3.1.2	Untersuchungen zur Beteiligung potentiell funktionaler Elemente an der Signaltransduktion des TSLP-Rezeptors	39
3.1.3	Vergleichende Untersuchungen zur Signalweiterleitung des humanen und des murinen TSLP-Rezeptors	42
3.1.4	Zusammenfassung	47
3.2	Der Ox40-Ligand und sein Promoter als TSLP-Zielstruktur	48
3.2.1	Etablierung eines Reporter-gen-basierten Systems zur Untersuchung der TSLP-induzierten Aktivierung des Ox40L-Promoters	48
3.2.2	Untersuchungen zur Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der TSLP-induzierten Aktivierung des Ox40L-Promoters	49
3.2.3	Inhibierung der Ox40L-Expression durch den inhibitorischen TSLPR α -Antikörper 1E10	53
3.2.4	Zusammenfassung	55

3.3	Die TSLP-Variante W148A	56
3.3.1	Herleitung einer Hypothese zu funktionellen Substrukturen des TSLP-Moleküls	56
3.3.2	Konstruktion einer potentiell inaktiven TSLP-Variante, Expression und funktionelle Analyse im Kontext von Bakteriendisplay	59
3.3.3	Rekombinante Herstellung der löslichen TSLP-Variante W148A	62
3.3.4	Funktionale Charakterisierung der TSLP-Variante W148A	63
3.3.5	Zusammenfassung	66
3.4	Rezeptorhybride auf der Basis des TSLP-Rezeptors	68
3.4.1	Erzeugung einer stabilen Reporterzelllinie für IL-13 auf der Basis eines TSLPR-basierten Hybridrezeptors	70
3.4.2	Aufbau eines Bioaktivitätsassays für das Interleukin 4 der Ratte auf der Basis eines TSLPR-basierten Hybridrezeptors	72
3.4.3	Generierung und Anwendung von TSLPR-basierten Hybridrezeptoren für Liganden von Rezeptortyrosinkinasen	73
3.4.4	Generierung und Anwendung von TSLPR-basierten Hybridrezeptoren für Liganden von Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren	77
3.4.5	Zusammenfassung	84
4	Diskussion	85
4.1	Die TSLP-induzierte Signaltransduktion	85
4.2	Der Ox40-Ligand als wichtiges Zielgen der TSLP-induzierten Signalkaskade	90
4.3	Die TSLP-Mutante W148A	94
4.4	Hybridrezeptoren auf der Basis des TSLP-Rezeptors	97
5	Zusammenfassung	101
	Literaturverzeichnis	103
6	Anhang	IX
6.1	Primer	IX
6.2	DNA-Sequenzen	XIII
6.3	Plasmidkarten	XIV
6.4	Abkürzungen	XVIII
6.5	Lebenslauf	XX
6.6	Förderungen	XXII
6.7	Danksagung	XXIII
6.8	Selbständigkeitserklärung	XXIV

Abbildungsverzeichnis

1	Der Einfluss von TSLP in der Allergen-induzierten Immunantwort	5
2	Schematische Darstellung des TSLP-Rezeptors	9
3	TSLP-induzierte dosisabhängige Proliferation von BaF3-Zellen durch stabile Transfektion der TSLP-Rezeptorketten	36
4	Analyse der durch den TSLP-Rezeptor induzierten JAK/STAT-Aktivierung in der Zelllinie BaF3-TSLPR	37
5	Betrachtung des Zusammenwirkens der TSLP-vermittelten Aktivierung der Janus-Kinasen und STATs	38
6	Darstellung der Basen- und Aminosäuresequenz des mutierten Ausschnitts der humanen TSLPR α - und IL-7R α -Kette	39
7	Durchflusszytometrische Analyse der zellulären Expression der mutierten Varianten der humanen TSLPR α - und IL-7R α -Ketten	40
8	Einfluss auf die hTSLP-induzierte STAT-Aktivität durch Austausch des Tyrosin an der Position 368 in der TSLPR α -Kette gegen Phenylalanin	41
9	Einfluss der Mutation der JAK-bindenden Box-1-Domäne auf die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren	42
10	Durchflusszytometrische Analyse der zellulären Expression der Rezeptorketten des humanen und murinen TSLP-Rezeptors	43
11	Durch den humanen und murinen TSLP-Rezeptor vermittelte zytokininduzierte STAT-Aktivierung	44
12	Schematische Darstellung der Klonierung der hIL-13Rex/TSLPRint-Rezeptorfusionen	45
13	Schematische Darstellung der möglichen Kombinationen bei der Fusion des humanen IL-13-Rezeptors mit dem humanen und murinen TSLP-Rezeptor	46
14	Zytometrische Analyse der Expression der IL-13Rex/TSLPRint-Hybridrezeptorketten auf BaF3-Zellen	46
15	Interspezies-Vergleich der TSLP-induzierten transkriptionalen Aktivität verschiedener STATs	47
16	Reportergenanalyse zur Analyse der hTSLP-vermittelten Stimulation des vollständigen Ox40L-Promoters in BaF3-TSLPR-Zellen	49
17	Schematische Darstellung der Klonierung des Ox40L-Promoters und seiner verschiedenen Fragmente in das Plasmid pGL4.26-luc	50

18	Reporteranalyse zum Einfluss der Promoterlänge auf die TSLP-induzierte Aktivierung von Ox40L	51
19	Analyse des Ox40L-Promoters auf mögliche Bindungsstellen im Bereich 300 bp upstream des Transkriptionsstartpunkts	52
20	Untersuchung zur Beteiligung des NF κ B-Signalweges an der TSLP-Rezeptor-Stimulation	53
21	Einfluss der Mutation der JAK-bindenden Box-1-Domäne auf die Aktivierung des Promoters für den Ox40-Liganden	54
22	Einfluss des inhibitorischen α -TSLPR α -Antikörpers 1E10 auf die Aktivierung des Ox40L-Promoters	55
23	Darstellung der möglichen Sekundärstruktur des Proteins TSLP verschiedener Spezies	58
24	Vergleich der Aminosäuresequenz des Zytokins TSLP verschiedener Spezies	59
25	Schematische Darstellung des Bakteriendisplay am Beispiel des TSLP	60
26	Zytometrischer Nachweis der Expression der wildtypischen und der mutierten TSLP-Variante auf der Bakterienoberfläche	61
27	Darstellung der Aktivität der wildtypischen und der mutierten Variante des TSLP unter Verwendung des Bakteriendisplay	62
28	Chromatogramm und Silbergel zur Aufreinigung des Proteins TSLP W148A	63
29	Antikörper-gestützte Untersuchungen zur strukturellen Integrität des hergestellten Proteins TSLP W148A	64
30	Untersuchung der Bindung von TSLP W148A an die TSLPR α -Rezeptorkette	65
31	Reporter-Gen-Assay zur Bestimmung der Aktivität des TSLP W148A	66
32	Schematische Darstellung eines Luciferase-Reporter-Gen-Systems auf der Basis von Hybridrezeptoren zur Bestimmung der biologischen Aktivität eines Zytokins am Beispiel von hIL-13	68
33	Reporter-Gen-Assay zum Vergleich der biologischen Aktivität von hIL-13 unter Verwendung der hIL-13Rex/hTSLPRint-Rezeptorhybride	70
34	Charakterisierung der stabilen Linie BaF3-hIL-13Rex/hTSLPRint bezüglich ihrer hIL-13-Responsivität	71
35	Verwendung des rIL-4Rex/hTSLPRint-Rezeptorhybrids zur Bestimmung der EC ₅₀ -Konzentration von produziertem rIL-4 mit Vergleich zu kommerziell erhältlichem rIL-4	73
36	Reporter-Gen-Assay zur Bestimmung der M-CSF-induzierten Stat1-Aktivität unter Verwendung der cFMSEX/TSLPRint-Hybride	74
37	Inhibition der ligandeninduzierten STAT1-Aktivierung des Rezeptors für hM-CSF durch die lösliche Rezeptordomäne c-FMSEX	75
38	Reporter-Gen-Assay zur Bestimmung der PDGF α -induzierten Stat3-Aktivität unter Verwendung von hCD140 α Ex/TSLPRint-Hybriden	76
39	Schematische Darstellung der Klonierung und Aminosäureabfolge der modifizierten Transmembrandomäne der TSLPR α - und IL-7R α -Rezeptorkette	79

40	Darstellung der TGF β -Rezeptor-vermittelten STAT1-Aktivität in Abhängigkeit von der gegenseitigen Rotation der Transmembran- (TMD) und intrazellulären Domänen	80
41	Reportergenanalyse zur Bestimmung der TGF- β -induzierten Aktivierung orientierungsoptimierter hTGF β Rex/TSLP β rint-Hybride	81
42	Zytometrische Charakterisierung von Antikörpern gegen die TGF β RII-Rezeptorkette	82
43	Beispielhafte Darstellung eines Reportergenversuchs zur Bestimmung der inhibitorischen Eigenschaft von Antikörpern gegen die TGF β RII-Rezeptorkette auf Basis der TGF β Rex/TSLP β rint-Hybridrezeptoren	83
44	Plasmidkarte pcDNA3.1(+)-Neo	XIV
45	Plasmidkarte pGL4.26-luc	XV
46	Plasmidkarte pRSet-5b	XV
47	Plasmidkarte pcDNA3.1-IL-13R α EX/IL-4R α Int	XVI
48	Plasmidkarte pcDNA3.1-IL-4R α EX/ γ cInt	XVI
49	Plasmidkarte pASKIEP-TSLP	XVII

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Zelllinien und Kulturmedien	14
2	Verwendete Plasmide	15
3	Verwendete Antikörper	16
4	Verwendete Primer	IX
5	Sequenzdaten aus der GenBank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)	XIII

1 Einleitung

Signalbotenstoffe und ihre Rezeptoren bilden die Grundlage für die spezifische und gerichtete Kommunikation von Zellen untereinander. Die Signalstoffe werden als Reaktion auf intrazelluläre Prozesse von Zellen ausgeschüttet und wirken in autokriner, parakriner oder endokriner Weise auf ihre unmittelbare und fernere zelluläre Umgebung. Erkannt werden diese Botenstoffe von Rezeptoren, welche auf der Oberfläche der Zielzellen exprimiert sind. Durch ihre Eigenschaft, die Zellmembran zu durchspannen, repräsentieren diese Proteine die Kontaktstelle zwischen dem Zellinneren und der zellulären Umwelt. Zu der größten Rezeptorgruppierung zählen die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Sie werden charakterisiert durch sieben Transmembrandomänen, sowie extrazellulären ligandenbindenden und intrazellulären signalauslösenden Loopstrukturen. Die intrazelluläre Signalweiterleitung wird über assoziierte G-Protein-Trimere realisiert, welche durch eine extrazelluläre Ligandenbindung hervorgerufene Konformationsänderung dissoziieren und damit verschiedenste physiologische Prozesse aktivieren ([111]). Eine weitere große Familie fasst die Rezeptoren für Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren zusammen. Sie sind maßgeblich an der Kommunikation zwischen Zellen und der Steuerung zellphysiologischer Prozesse beteiligt. Anhand ihrer Struktur und ihrer intrazellulären Signalkaskade wurden sie nach Taga et al. in verschiedene Rezeptorfamilien eingeteilt. Sie alle besitzen nur einen transmembranen Bereich, sowie eine extrazelluläre ligandenbindende und eine intrazelluläre signalinduzierende Domäne. Um als funktioneller Komplex vorliegen zu können, formieren sich aus den einzelnen Rezeptorketten Homo- oder Heterodimere bis hin zu Heterooligomeren. Diese Komplexe können präassoziiert vorliegen oder werden durch die Bindung des Liganden zusammengeführt. Durch diese extrazelluläre Komplexbildung kommen die intrazellulären Bereiche in räumliche Nähe und können damit Signalprozesse induzieren ([137]). Die Familie der haematopoetischen Rezeptoren unterteilt sich nach dem Aufbau ihrer extrazellulären Domäne in Klasse I- und Klasse II-Rezeptoren. Zur intrazellulären Signalweiterleitung besitzen sie Bindungsstellen für assoziierte Tyrosinkinasen ([58]). Mitglieder der Familien der Rezeptortyrosinkinasen und der Serin/Threoninkinaserezeptoren (Rezeptoren der TGF β -Superfamilie) besitzen keine Bindungsstellen für assoziierende Kinasen, da sie selber über die Möglichkeit verfügen, über Phosphorylierung der Tyrosine, Serine und Threonine Signale zu induzieren ([56], [88], [10]). Diese Einteilung wird bis heute beibehalten, auch wenn die Familien durch die Entdeckung von neuen Rezeptoren stetig anwachsen. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Forschung an Rezeptoren und deren Interaktionspartner um ein besseres Verständnis von grundsätzlichen physiologischen Prozessen zu erhalten. Da die Fehlregulation von Zytokin-Rezeptor-Interaktionen durch Über- oder Unterexpression der beteiligten Moleküle

immer öfter als Ursache für medizinische Krankheitsbilder angesehen wird, rücken Zytokine und Rezeptoren immer mehr in den Blickpunkt der Therapie. Auf mehreren Ebenen lassen sich diese dysregulierenden zytokininduzierten Signale beeinflussen. Angriffspunkte können dabei auf jeder Ebene der Signalkaskade liegen (Zytokine und Rezeptoren, intrazelluläre Signalwege und Protein-Transkriptionsprozesse). Aufgrund der einfacheren Zugänglichkeit und spezifischeren Wirkweise stellt die Beeinflussung von Zytokin-Rezeptor-Interaktionen als medizinische Therapiestrategie einen vielversprechenden Ansatz dar. Hier wären zu nennen Zytokin- und Rezeptorbindende Antikörper, monomere und dimere lösliche Rezeptordomänen als Zytokin-Fallen und Zytokin-Antagonisten, welche den Rezeptor binden und damit Bindungsstellen blockieren, ohne den Rezeptor zu aktivieren ([125]).

Die Bedeutung der Fehlregulation von inflammatorischen Zytokinen zeigt sich am Beispiel des asthmatisch-entzündlichen Geschehens. Verschiedene Subpopulationen der T-Helferzellen (TH_1 -, TH_2 -, TH_{17} -Zellen und T_{regs}) werden durch antigenpräsentierende Zellen und durch pro- und anti-inflammatorische Zytokine, ausgeschüttet von verschiedenen Zellen des Immunsystems, aktiviert und sind gegenseitig für die Ausbildung einer balancierten Immunantwort zuständig. Die Ausbildung asthmatischer Prozesse scheint ihre Ursache in einem Fehlen dieser Balance zu haben. Besonders Zytokine, welche die TH_2 -Antwort induzieren, werden maßgeblich für das Auslösen asthmatischer Symptome verantwortlich gemacht ([120]). Zu diesen zählen besonders $TNF\alpha$, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13. In näherer Vergangenheit wurde das Zytokin *Thymic Stromal lymphopoietin* (TSLP) charakterisiert und ebenfalls den TH_2 -assoziierten Zytokinen zugeordnet. Zusammen mit den Zytokinen IL-33 und IL-25, welche ebenfalls verstärkt durch epitheliale Zellen exprimiert werden, wird es aktuell als Schlüsselmolekül bei der Ausbildung von asthmatischen Erkrankungen angesehen ([11]).

1.1 Das Zytokin Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) als neue Zielstruktur bei der Behandlung pathophysiologischer Prozesse

Friend et al. beschreiben 1994 einen murinen Faktor, welcher von der Thymus-Stroma-Zelllinie Z210R.1 sezerniert wird. Vorhanden im konditionierten Medium dieser Zelllinie ist er in der Lage, die Differenzierung von IgM+-B-Zellen in vitro und das Langzeitwachstum einer B-Zelllinie NAG8/7 zu unterstützen. Charakterisierungen hinsichtlich der Zusammensetzung des konditionierten Mediums, insbesondere Zytokinkonzentrationen, zeigten, dass zwar IL-7, jedoch keine weiteren bekannten Zytokine (z.B. IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, M-CSF or G-CSF) vorhanden waren. Da IL-7 selber nicht in der Lage ist NAG7/8-Zellen zu stimulieren, wurde von einem oder mehreren neuen Zytokinen in dem Zellüberstand ausgegangen ([43]). Der hier beschriebene Faktor wurde etwas später als Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) bezeichnet und die Eigenschaft zugesprochen, das Wachstum von B-Zellen zu unterstützen ([116]). Zusätzlich zu den B-Zellen kann TSLP die Bildung von T-Zellen, insbesondere CD4+- und CD8+-T-Zellen induzieren ([3]).

Durch Sims et al. konnte das murine TSLP im Jahr 2000 zum ersten Mal aus der cDNA der zuvor beschriebenen Zelllinie Z210R.1 kloniert und anschließend rekombinant produziert werden,

2001 erfolgte die Klonierung und Charakterisierung des humanen TSLP. Bei dem murinen TSLP handelt es sich um ein 121 Aminosäuren, bzw. ca. 14 kDa großes Protein, welches durch Glykosylierung als ca. 20-24 kDa groß beschrieben wird. Es konnten 3 Glykosylierungsstellen identifiziert werden, sowie 7 Cysteine, welche 3 intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden, jedoch keine Dimerisierung des Proteins bewirken. Das humane Protein, welches zu seinem murinen Homolog nur eine sequenzielle Übereinstimmung von ca. 43 % aufweist, wird hingegen als ein 159 Aminosäuren großes Peptid beschrieben. Ohne die 29 Aminosäuren des Signalpeptids besitzt das reife Protein eine Größe von ca. 14,9 kDa, 2 Glykosylierungsstellen und 6 Cysteine. Strukturell wird es der Familie der 4-Helix-Bündel Zytokine zugeordnet. Bei der Untersuchung hinsichtlich der Expression von verschiedenen murinen Geweben zeigte sich, dass murines TSLP stark in Lunge, Thymus und Darm sowie schwach in Lymphknoten, Gehirn, Herz, Leber, Niere und Milz exprimiert wird. Hingegen wird humanes TSLP in Herz, Leber, Hoden und Prostata stark exprimiert, in Lunge, Skelettmuskulatur, Niere, Milz, Dünn- und Dickdarm in geringerer Konzentration ([79], [132], [114], [117]). Bei der Untersuchung verschiedener humaner Zelllinien und aufgereinigter primärer Zellen wird neben Mast-Zellen besonders nicht-haematopoetischen Zellen, wie z.B. Epithelzellen, Haut-Keratinozyten, Lungen-Fibroblasten und Zellen der glatten Muskulatur der Lunge (Smooth muscle cells) die Fähigkeit zugesprochen, TSLP in großen Mengen zu produzieren. Dabei konnte die TSLP-Expression dieser Zellen durch die Zugabe pro-inflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-4, IL-13 und $\text{TNF}\alpha$ oder IL-1 β und $\text{TNF}\alpha$ noch gesteigert werden.

Bei in vivo-Untersuchungen wurden besonders hohe Mengen TSLP durch Keratinozyten von Patienten mit akuter und chronischer atopischer Dermatitis gebildet. Dadurch wird eine starke Aktivierung von Langerhansschen Zellen hervorgerufen, welche anschließend in die Lymphknoten wandern und dort allergenspezifische TH_2 -Antworten auslösen. Von Hautzellen ausgeschüttetes TSLP war ebenfalls in der Lage, Dendritische Zellen (DCs) in ihrer Reifung zu induzieren ([16], [95]). Haematopoetischen Zellen wie B-Zellen, Natürliche Killerzellen, T-Zellen, Granulozyten und Makrophagen, sowie Dendritische Zellen zeigten selbst keine TSLP-Expression. ([134], [64], [65]).

Ausgehend von den Hinweisen, dass TSLP eine Schlüsselrolle im asthmatischen Geschehen spielt, wurde der Gehalt an exprimierten TSLP in bronchialen Epithelzellen bei Asthmatikern und Kontrollgruppen verglichen und eine signifikant erhöhte Expression bei der Gruppe der Asthmatiker festgestellt ([157]). Um der Frage nachzugehen, welche Faktoren die Expression von TSLP durch Epithelzellen auslösen, wurden Epithelzellen der kleinen Atemwege mit verschiedenen Stimuli auf mRNA-Ebene untersucht. TSLP konnten dabei insbesondere durch folgende Moleküle in seiner Expression gesteigert werden: IL-1 β und $\text{TNF}\alpha$, als Zytokine vorhanden in einer entzündeten Umgebung, pro-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13, verschiedene Liganden der Toll-like-Rezeptoren 2, 8 und 9 (TLRs), doppelsträngige RNA (Ligand für TLR3), bakterielles Peptidoglycan und Rhinovirusprovokation (einzelssträngige RNA). Diese wird hierbei intrazellulär durch die Signalmediatoren RelA, NF κ B1 und IRF3 vermittelt, was auf eine Beteiligung des NF κ B-Signalweges hinweist. Bestätigt wird dies durch Promoteranalysen des humanen und murinen TSLP-Promoters, welche beide eine NF κ B-Bindestelle aufweisen

und deren Mutation eine TSLP-Expression unterdrücken kann. Dabei wird die Bindung eines p65/p50-Heterodimers an den Promoter beschrieben ([5], [64], [78], [162]). Da viele Zellen des bronchialen Epithelgewebes TSLP nach Stimulation exprimieren können, aber gleichzeitig auch den Rezeptor für TSLP auf ihrer Oberfläche exprimieren, wird diskutiert ob diese Zellen nicht auch selber Target ihrer eigenen TSLP-Expression sind und sich somit in einer autokrinen oder parakrinen Weise selber stimulieren, was zu einer Verstärkung der allergischen Reaktion führen kann ([118]). Verschiedene Allergene wirken verstärkend auf die TSLP-Expression von humanen Epithelzellen der Atemwege. So konnten Trypsin und Papain, Proteasen, welche auch in natürlichen Allergenen vorhanden sind, Extrakte von Allergie-auslösenden Pilzen (*Alternaria*), weiterhin Hausstaubmilben und Pollen, Dieselabgase und Zigarettenrauch als mögliche Induktoren für TSLP-Expression durch Lungenepithelzellen, Membranbestandteile von *Staphylococcus aureus* für TSLP-Expression durch Hautkeratinozyten und Hepatitis C-Virus (HCV) als möglicher Induktor für die TSLP-Expression in Hepatozythen identifiziert werden ([83], [15], [133], [147], [77], [27], [68]).

Hinsichtlich seiner Funktion zeigte sich über die letzten Jahre, wie weitreichend TSLP in entzündliche Prozesse, aber auch in das Krebsgeschehen eingreift. Eine Schlüsselrolle wird TSLP dabei in allergisch-entzündlichen Abläufen zugesprochen, denn es zeigt Einfluss auf verschiedene Zellpopulationen des adaptiven Immunsystems. So beeinflusst TSLP die Expression von verschiedenen Chemokinen, besonders CCL17, CCL19 und CCL22 in humanen Monozyten und weiterhin die Reifung und Kultivierung frisch isolierter CD11c+-DCs in vitro ([117], [134]). Dabei werden auf Dendritischen Zellen das Antigen-präsentierende Molekül HLA-DR, ein MHC-Klasse II-Zelloberflächenrezeptor, und weitere ko-stimulierende Moleküle, z.B. CD80, CD83, CD 86 hochreguliert. Diese TSLP-aktivierten DCs besitzen die Fähigkeit, native CD4+-T-Zellen in Ko-Kultur hinsichtlich ihrer Proliferation und Expansion zu aktivieren. Sie lösen weiterhin eine Sezernierung von hohen Mengen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-4, IL-13, TNF α und IL-5 aus, jedoch nur von sehr geringen Mengen der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IFN γ . Durch die zusätzliche Expression großer Mengen der Chemokine IL-8 und Eotaxin-2, welche Eosinophile und Neutrophile anlocken, sowie von TARC (CCL17) und MDC (CCL22), welche wiederum CCR4-positive TH₂-Zellen anlocken können, ergibt sich hier ein spezielles proallergisches TH₂-Milieu (siehe Abbildung 1).

Um den Link zwischen TSLP-induzierten DCs und TSLP-DCs-induzierten nativen CD4+-T-Zellen genauer zu untersuchen, wurden Genexpressions-Arrays TSLP-stimulierter humaner CDs durchgeführt, wobei ein Mitglied der TNF Superfamilie, OX40-Ligand (OX40L), neben anderen Faktoren in hohem Maße exprimiert wurde. Die Expression von OX40L konnte zusätzlich mittels RT-PCR, Zytometrie und unter Verwendung von anti-OX40L-Antikörpern bestätigt werden. Dabei scheint die Expression des OX40-Liganden der entscheidende Faktor zu sein, welcher das Auslösen der herkömmlichen, durch IL-4 induzierten TH₂-Antwort (Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und anti-inflammatorisches IL-10), hin zu einer inflammatorischen Th2-Antwort (Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und TNF α , keine Expression des anti-inflammatorischen IL-10) induziert ([134], [149], [62]). Das Gen für den Ox40L wird daher als Hauptzielgen für die TSLP-induzierte

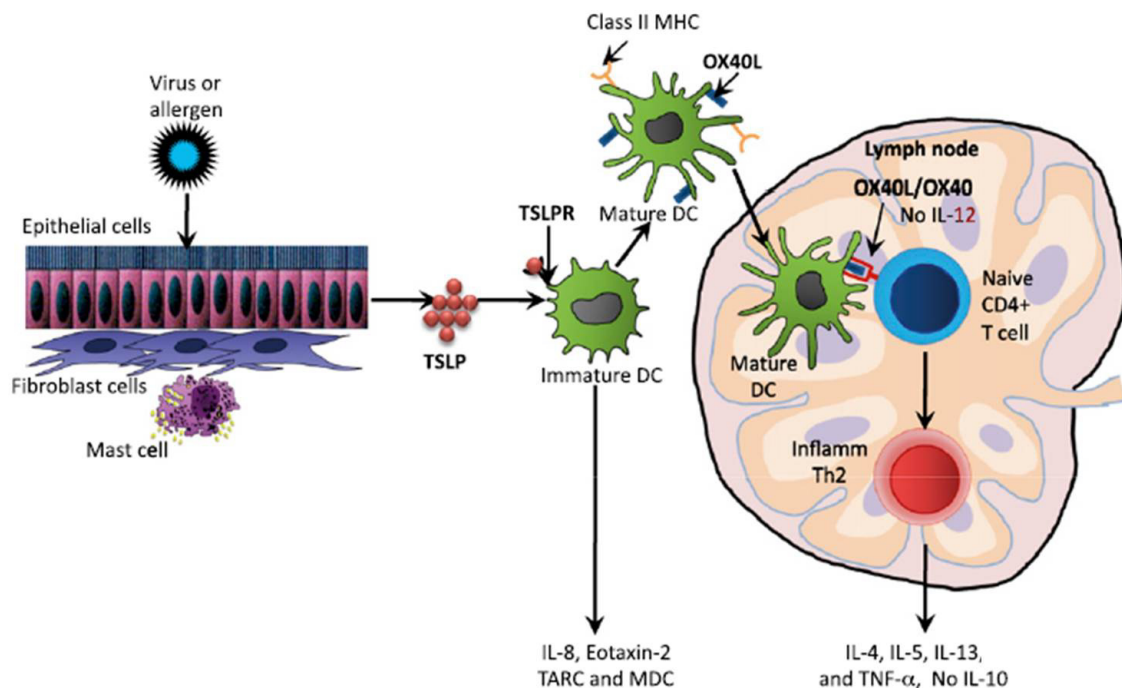


Abbildung 1: Der Einfluss von TSLP in der Allergen-induzierten Immunantwort TSLP wird von Epithelzellen nach Allergen- und Viruskontakt ausgeschüttet und wirkt auf Mastzellen und Dendritische Zellen (DCs). Dendritische Zellen differenzieren durch TSLP-Stimulation zu reifen DCs, wandern in die Lymphknoten und aktivieren dort über den exprimierten OX40-Ligand native T-Zellen zum Auslösen einer TH₂-Immunantwort über die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine. Abbildung modifiziert nach ([65]).

Signalkaskade angesehen.

Zusätzlich zu CD4+-T-Zellen können auch CD4+-Gedächtnis-T-Zellen und CD8+-T-Zellen durch TSLP-induzierte DCs (TSLP-DCs) hinsichtlich Expansion und Differenzierung, sowie der Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-5 und IL-13 aktiviert werden ([46], [149]). Unabhängig von der Stimulation von CD4+-T-Zellen durch TSLP-induzierte DCs sind diese Zellen aber auch ein direktes Target für TSLP. So exprimieren CD4+-T-Zellen ebenfalls beide für den TSLP-Rezeptor benötigten Rezeptorketten nach Aktivierung mit T-Zell-aktivierenden anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern. Sie weisen zudem eine Aktivierung von STAT5 auf Phosphorylierungsebene auf und zeigen TSLP-abhängige Proliferation. Diese wird hervorgerufen durch verstärkte STAT5-vermittelte Expression der IL-2R α -Kette des IL-2-Rezeptors und daraus folgende erhöhte Sensitivität der Zellen auf IL-2, ein Zytokin, welches auch T-Zell-Wachstumsfaktor genannt wird ([121]). Diese TSLP-induzierte, DC-unabhängige Stimulation ist ebenso bei CD8+-T-Zellen festzustellen, auch hier zeigt sich nach TCR-Stimulation (Stimulation T-Zell-Rezeptor über anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper) eine leichte Expression der TSLPR α -Rezeptorkette sowie eine TSLP-abhängige Expansion der Zellen ([1]).

Neben Dendritischen Zellen und T-Zellen werden auch Mastzellen und Zellen der glatten Muskulatur der Atemwege (*Airway Smooth Muscle cells* – ASM) durch TSLP aktiviert, was mit hoher Expression pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine wie z.B. IL-5,

IL-13, IL-6, GM-CSF, CXCL8, CCL1 und CCL11 einhergeht ([5], [129]). Im murinen System konnten Al-Shami et al. die Expression des TSLPR auf murinen DCs nachweisen, darüber hinaus die Expression von CD80, CD86 und MHCII auf OVA-stimulierten CD11c+-DCs. Unter Verwendung eines durch Ovalbumin (OVA)-induzierbaren Asthmamodells wurde erstmals der Bezug von TSLP zum asthmatischen Geschehen gezeigt. TSLPR-Knockout-Mäuse wiesen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen sehr viel geringere Anzeichen einer asthmatischen Entzündung auf, welche sich durch perivaskuläre Entzündung, vermehrter Bildung von schleimproduzierenden Becherzellen in den Bronchien und erhöhter Einwanderung von Eosinophilen und Neutrophilen auszeichnet. Weiterhin zeigte sich bei diesen KO-(Knockout)-Mäusen kein signifikanter Anstieg der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, IL-13 und IL-4 waren sogar nur verringert vorhanden. Eine verstärkte Einwanderung von Leukozyten und erhöhte Schleimproduktion wurde ebenfalls nur bei den TSLPR-positiven Mäusen nachgewiesen, ebenso ein erhöhter Gehalt von IgE im Serum. Diese Befunde gehen weiterhin einher mit einer Veränderung der Luftwege, besonders durch das Einwandern von Epithelzellen, subepithelialer Fibrosierung und Erhöhung der Muskelmasse glatter Muskulatur, sowie einer Überempfindlichkeit der Atemwege ([4], [169]). Es zeigte sich eine Erhöhung des Levels an pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-4, IL-5- und IL-13, außerdem konnte TSLP in BAL-Flüssigkeiten der OVA-induzierten Asthma-Mäuse gemessen werden, womit eine erhöhte Empfindlichkeit der Atemwegen auf Allergene etabliert wird ([85], [50]).

Daten aus der Expression von TSLP in verschiedenen Geweben geben Hinweis darauf, dass TSLP nicht nur in entzündlichen Prozessen der Atemwege, sondern auch solchen der Haut involviert ist. Induzierbare TSLP-Expression führte in murinem Hautgewebe zu einer ausgeprägten atopischen Dermatitis mit typischen Symptomen wie Ekzembildung, Akanthose und Spongiose ([159]). Eine DC-unabhängige CD4+-T-Zell-Stimulation, gekennzeichnet durch die Proliferation und Differenzierung zu TH₂-Zytokin-produzierenden Zellen, sowie durch Proliferation von TH₂-Zellen selbst konnte im Mausmodell gezeigt werden ([106], [66]).

Während nur ca. 4-8% der Bevölkerung an Asthma leiden, entwickeln ca. 70% der Patienten mit schwerer atopischer Dermatitis (AD), einer allergisch-entzündlichen Erkrankung der Haut, welche besonders häufig im Kindesalter auftritt, im Laufe ihres Lebens eine asthmatische Erkrankung. Diese Entwicklung wird als 'atopischer Marsch' bezeichnet. Es gibt mehrere Ansätze, die dieses Phänomen erklären. So kann ein durch die AD entstandener Defekt der Barrierefunktion der Haut dazu führen, dass Allergene vermehrt und direkter aufgenommen werden und somit eine Überstimulation der Immunzellen bewirken. Das Auslösen von Asthma ohne Allergen-Provokation oder geschädigte Hautbarriere ist ebenfalls beschrieben, hier wird der Einfluss eines systemischen Faktors vermutet. In AD-Mausmodellen konnte TSLP als auslösender Faktor identifiziert werden, welcher durch epidermale Zellen der Haut überexprimiert wird und eine Überempfindlichkeit der Lunge auf Allergenprovokation bewirkt. Dabei sind die bekannten Symptome einer allergischer Entzündung wie Atemwegsüberempfindlichkeit und- Entzündung, Erhöhung der Schleimproduktion und Steigerung des IgE-Levels, induziert durch verstärkte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, zu beobachten ([35], [165], [82]).

Neben seinen beschriebenen Funktionen im allergischen Geschehen rückt TSLP im Bereich der Krebserkrankungen in den Fokus der Forschung. Besonders bei der Etablierung einer lymphatischen Leukämie, aber auch in Tumoren anderer Gewebe wird eine Einwirkung von TSLP diskutiert. Gut untersucht ist die Rolle von TSLP im Krankheitsbild der B-ALL (Akute Lymphoblastische Leukämie der B-Zellen), hier wird zusätzlich die tumorfördernde Rolle der gesteigerten Expression des TSLP-Rezeptors festgestellt. Eine Überexpression des CRLF2-Gens (Synonym für den TSLP-Rezeptor), welche in 7 % bis 14 % der untersuchten Pro-B-ALL-Fälle (je nach Publikation variierend) diagnostiziert wird, führt zu einer verschlechterten Prognose und erhöhtem Rückfallrisiko. Diese Überexpression, hervorgerufen durch chromosomale Translokations- und Deletionsprozesse, geht häufig einher mit einer Mutation der Pseudokinasedomäne von JAK2, was die Prognose der Patienten zusätzlich verschlimmert ([22], [97], [123], [49]), da dadurch eine dauerhafte STAT5-Aktivierung induziert wird, welche zu zytokinunabhängigem Wachstum haematopoetischer Vorläuferzellen führt. Betrachtet man nur die Fälle von Down-Syndrom-assoziiierter ALL, erhöhte sich deren Anzahl sogar auf 62 %. Zusätzlich konnte eine Mutation der TSLP-Rezeptorkette identifiziert werden, welche über die Aktivierung von JAK2 eine erhöhte Proliferation induzieren kann. Bei dieser Mutation wird im Bereich der Transmembrandomäne (Position 232) die Aminosäure Phenylalanin gegen Cystein ausgetauscht. ([52], [25]). Damit kann die Mutation eine Homodimersierung der TSLPRa-Rezeptorkette induzieren, im Zusammenspiel mit der beschriebenen Mutation von JAK2 induziert dieser Rezeptor sogar ein proliferatives Signal über Phosphorylierung von STAT5 ohne die Verwendung der IL7Ra-Kette, ist aber bei Stimulation mit TSLP nicht reaktiv ([158]). Die Rolle von TSLP in entzündlichen Reaktionen in der Umgebung von Tumoren wird zusätzlich, allerdings sehr kontrovers diskutiert. Dabei werden TSLP sowohl anti- als auch prokanzerogene Eigenschaften zugesprochen. TSLP kann als Tumorsuppressor besonders in frühen Stadien der Tumorentwicklung angesehen werden, agierend vermutlich über die Aktivierung von CD8+- und CD4+-T-Zellen ([37], [36]). TSLP zeigt aber auch tumorfördernde Funktionen. So schütten tumorassoziierte Fibroblasten bei Pankreaskrebs, induziert durch pro-inflammatorische Zytokine, vermehrt TSLP aus, aktivieren damit myeloide Dendritische Zellen (DCs) und fördern ein TH₂-inflammatorisches, anstelle eines TH₁-Tumor-infiltrierendes Milieu in der Umgebung des Tumors, was für den Patienten mit einer verschlechterten Prognose einhergeht ([34]). Vergleichbare Ergebnisse liegen aus Untersuchungen von Brustkrebszelllinien und primären Zellmaterial von humanen Brusttumoren vor, welche ebenfalls TSLP im erhöhten Maße sezernieren. Inwieweit allerdings die Induktion eines pro-inflammatorischen TH₂-Milieus die Tumorentstehung fördert, ist noch nicht genau geklärt. Höchstwahrscheinlich ist auch die Expression von immunsuppressiven Chemokinen und Zytokinen, wie z.B. IL-10, beteiligt ([105], [110]).

1.2 Die Signaltransduktion des TSLP-Rezeptors

Um therapeutische Ansätze zur Regulation von TSLP-induzierten Prozessen zu etablieren, ist es notwendig, die intrazelluläre Signalweiterleitung des Rezeptors genauer zu verstehen.

Auf dieser Grundlage ist es möglich, das Potential möglicher inhibitorischer Moleküle zu bestimmen. 1999 wurden von Levin et al. die ersten Versuche zur Aufklärung des Aufbaus des murinen Rezeptors für TSLP und dessen Signalweiterleitung durchgeführt. Unter Verwendung von Antikörpern gegen die IL-7-Rezeptor-alpha-Kette (IL-7R α), jedoch nicht durch Antikörper gegen die zweite Rezeptorkette des IL-7-Rezeptors (IL-2R γ) war es möglich, die Proliferation der faktorabhängigen murinen pro-B-Zelllinie NAG8/7 zu inhibieren. Daraus konnte geschlossen werden, dass die IL-7R α -Kette, jedoch nicht die IL-2R γ -Kette dem funktionalen Rezeptor für TSLP zugehört. Weiterhin konnte in Western Blot-Analysen festgestellt werden, dass beide Zytokine (IL-7 wie auch TSLP) den Transkriptionsfaktor STAT5 phosphorylieren, IL-7 allerdings unter der Beteiligung JAK1 und JAK3, während TSLP-Stimulation keines der Mitglieder der Familie der Janus-Kinasen (JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2) phosphorylieren und damit aktivieren konnte ([81], [59]). Desweiteren wurde erstmals die transkriptionale Aktivität von STAT5 (*Signaling Transducer and Activator of Transcription* 5) im Luciferase-Reportergen-Assay gezeigt ([59]). Dass die Signalweiterleitung des murinen TSLP-Rezeptors nicht nur auf dem Transkriptionsfaktor STAT5 basiert, zeigten Isaksen et al. 1999 in ihren Experimenten. Dabei ist murines TSLP nicht in der Lage, bei verschiedenen Zelltypen, welche den TSLP-Rezeptor exprimieren, trotz STAT5-Aktivierung Proliferation zu induzieren, was auf die Beteiligung weiterer Signalmoleküle hinweist. Durch Punktmutationen, bei denen für die JAK/STAT-Bindung und -Aktivierung benötigten Box1-Domänen der TSLPR α - wie auch der IL-7R α -Kette entfernt wurden, ließ sich die STAT5-Aktivierung und induzierte Proliferation fast völlig auslöschen. Austausch des einzelnen c-terminalen Tyrosinrests (Y103) gegen Phenylalanin (F) in der TSLPR α -Kette, sowie aller vier Tyrosine der IL-7R α -Kette führten nur dann zu einer Reduktion der STAT5-Aktivität, wenn beide Rezeptorketten mutiert und exprimiert wurden ([60]). Einige Ergebnisse aus dem murinen System ließen sich im humanen System bestätigen, wie z.B. eine Tyrosin-Phosphorylierung von STAT5, ohne Rekrutierung von JAK3 detektiert in der AML-abgeleiteten, faktorabhängigen humanen Zelllinie MUTZ-3. Die Verwendung von Antikörpern gegen die humane IL-7R α -Kette bestätigte die Annahme aus dem murinen System, dass die IL-7R α -Kette zusammen mit einer weiteren Rezeptorkette für die TSLP-induzierte Proliferation der MUTZ-3-Zelllinie verantwortlich ist ([114]).

Die Klonierung der murinen TSLPR α -Kette erfolgte fast zeitgleich durch zwei Arbeitsgruppen, wobei beide Gruppen die Heterodimerisierung von TSLPR α und IL-7R α nach TSLP-Bindung beschrieben und zeigten, dass in dieser Konstitution ein TSLP-induziertes Signal ausgelöst werden kann. Für die Bindung des TSLP an seinen Rezeptor wird ein ähnlicher Mechanismus wie bereits für IL-7 oder verwandte Zytokine beschrieben. Zunächst bindet TSLP mit geringer Affinität an die spezifische TSLPR α -Kette. Für die Ausbildung eines funktionalen Rezeptors wird zusätzlich die Anwesenheit der IL-7R α -Kette benötigt. Diese zeigt keine eigene Bindung an TSLP, führt aber zur Ausbildung eines hoch-affinen Rezeptor-Ligand-Komplexes (siehe Abbildung 2). Die TSLPR α -Rezeptorkette wird als 370 Aminosäuren groß beschrieben, mit einer Transmembrandomäne, 2 Glykosylierungsstellen und einer 104 AS großen zytoplasmatischen, intrazellulären Domäne mit einem Tyrosinrest. Das Protein wird in fast allen Geweben

exprimiert, hauptsächlich allerdings in Leber, Lunge und Hoden, geringer auch in Gehirn, Herz, Niere und Milz. Das für die murine TSLPR α -Kette codierende Gen liegt auf dem Chromosom 5 ([108], [109]). Ausgehend von der Aminosäuresequenz der murinen TSLPR α -Rezeptorkette

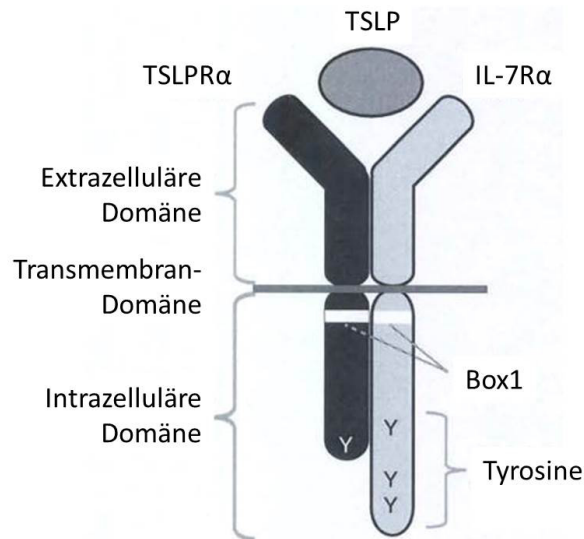


Abbildung 2: Schematische Darstellung des TSLP-Rezeptors Der Rezeptor für TSLP besteht aus der TSLPR α - und der IL-7R α -Rezeptorkette. Beide Ketten besitzen eine extrazelluläre und eine zytosolische Domäne, sowie eine Transmembrandomäne. Die Phosphorylierung des Rezeptors findet an den dargestellten Tyrosinen (Y) statt, die Box1-Domäne ist für die Bindung von Kinasen zuständig (Abbildung modifiziert nach [61]).

konnte über ein Alignment der Proteinsequenzen mit einer Übereinstimmung von 39 % (Übereinstimmung zur humanen IL-2R γ -Kette 24 %) die 371 AS lange Sequenz der humanen TSLPR α -Kette identifiziert werden. Parallel dazu wurde die humane TSLPR α -Kette von vier anderen Gruppen beschrieben, allerdings ohne sie der hIL-7R α -Kette oder jeglichen Funktionen zuordnen zu können. Zhang et al. nannten das identifizierte Protein CRL2 (*Cytokine receptor-like molecule 2*). Tonozyuka et al. nannten die von ihnen klonierte Rezeptorkette CRLF2 (*Cytokine receptor-like factor 2*), diese Bezeichnung der TSLPR α -Kette wird besonders in der Beschreibung des Rezeptors im Krebs-Geschehen aktuell weiter verwendet ([54], [44], [164], [141]).

Die Untersuchung von humanen cDNAs aus verschiedenen Zell- und Gewebetypen mittels quantitativer PCR zeigte, dass hauptsächlich Dendritische Zellen, Monozyten, Zellen der glatten Muskulatur der Atemwege (HASM) und Mastzellen, in geringerem Maße auch T-Zellen und Eosinophile die TSLPR α - sowie die IL-7R α -Kette exprimieren und damit durch TSLP beeinflusst werden können ([117], [5], [153], [129], [57]). Die Ausbildung des funktionalen Rezeptors für das humane TSLP induziert in BaF3-Zellen die Phosphorylierung von STAT3 und STAT5 ([117]). Eine weitere Beteiligung von Mitgliedern der Janus-, Src- oder Tec-Kinase-Familien, sowie anderer Signalmoleküle an der TSLP-Induzierten Signalweiterleitung des humanen Rezeptors konnte nicht beschrieben werden. Als Beispiel von humanen primären Zellen konnte die STAT5-, allerdings keine STAT1- und STAT3- Aktivierung in voraktivierten CD4+-T-Zellen auf Phosphorylierungsebene bestätigt werden ([121]). Hinsichtlich der Signaltransduktion des murinen, wie auch des humanen Rezeptors sind zum jetzigen

Zeitpunkt einige Fakten bekannt, jedoch auch noch viele Fragen offen. Mit STAT3 und STAT5 konnten schon zwei Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Über welche Signalmoleküle diese aktiviert werden, wenn nicht über JAKs, ist allerdings noch unklar. Die vorliegende Arbeit soll hierbei helfen, die TSLP-induzierte Signalweiterleitung besser zu verstehen um damit auch mögliche therapeutische Angriffspunkte zu finden. Weiterhin ist es wichtig, das Signaling der murinen und des humanen Rezeptors zu vergleichen um festzustellen, inwiefern Ergebnisse aus dem murinen auf das humane System übertragen werden können.

1.3 Ansätze zur Beeinflussung von zytokinvermittelten pathophysiologischen Prozessen am Beispiel TSLP-induzierter Entzündungsprozesse

Zur systemischen Behandlung von allergischen Reaktionen und asthmatischen Anfällen werden häufig Glucocorticoide eingesetzt. Diese wirken entzündungshemmend und abschwellend auf die Bronchialschleimhaut, sowie entkrampfend auf die bronchiale Muskulatur. Deren Anwendung wird aber auch als regulierend auf die TSLP-Expression diskutiert. In Haut-Keratinocyten und humanen bronchialen epithelialen Zellen (NHBEs) kann unter Verwendung von Glucocorticoiden (z.B. Dexamethason) und Relaxansen der kleinen Atemwege (z.B. Capsazepine) die durch Inkubation mit dsRNA hervorgerufene TSLP-Expression herunterreguliert werden ([64], [76], [19], [87]). Im Bereich der Tumorerkrankungen wird eher die Beeinflussung von Signalwegen durch verschiedene Signalwegsinhibitoren (*STIs* - *signal transduction inhibitors*) angestrebt, welche in der Therapie bereits Anwendung finden. Dabei kommen verschiedene Inhibitoren des mTOR-Signalweges (z.B. Rapamycin) und des JAK/STAT-Weges, wie z. B. Ruxolitinib als JAK-Inhibitor zum Einsatz. Diese Inhibitoren werden aber auch für die Therapie der Formen von ALL vorgeschlagen, welche mit einer Überexpression des TSLPR einhergehen und damit eine erhöhte Aktivität des JAK/STAT-Weges über JAK2 und STAT5 aufweisen ([139]).

Zum spezifischeren Eingriff stehen mehrere Methoden zur Verfügung, um die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand zu blockieren und somit die Aktivierung des Rezeptors mit nachfolgenden Prozessen zu verhindern. Durch ihre extrazelluläre Expression sind Rezeptoren und Liganden vielversprechende Targets für Antikörper. Für die länger bekannten Zytokine der TH₂-Immunantwort (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, TNF α) sind bereits entsprechende Ansätze zu deren Regulierung gefunden wurden. Zumeist handelt es sich hierbei um poly- oder monoklonale Antikörper, welche gegen das Zytokin selber oder gegen die Rezeptorketten des spezifischen Zytokinrezeptors gerichtet sind und durch ihre Eigenschaften die Rezeptor-Liganden-Bindung beeinflussen. Diese Antikörper befinden sich meist bereits in der vorklinischen Forschungsphase, teilweise sogar schon in klinischen Studien. Mepolizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen IL-5, kann in klinischen Studien die Anzahl der Eosinophilen in Blut und Sputum reduzieren, wodurch die Anzahl und Dauer der Asthmaanfälle ebenfalls reduziert wurde. Für IL-4 und IL-13 befinden sich mehrere verschiedene Antikörper in verschiedensten Phasen der klinischen Studien ([23]). Omalizumab (im Handel Xolair genannt, hergestellt von Novartis), ein Antikörper gegen

IgE, welches verantwortlich ist für die Ausschüttung allergieinduzierender Mediatoren, wie z.B. Histamin, führt durch seine Bindung zu einer verkürzten Verweildauer und einer Reduzierung von freiem IgE im Körper. Dies resultiert zusätzlich in einer Herunterregulierung der Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors (FcεRI) auf Mastzellen und Basophilen ([24]). Dieser Antikörper reduzierte in Phase-III-Studien signifikant die Anzahl der Asthma-Anfälle, sowie deren Dauer und Schwere und wurde 2003 von der amerikanischen FDA (Food and Drug Administration) zur Behandlung von allergischem Asthma bei Jugendlichen und Erwachsenen freigegeben ([21], [23]).

Im murinen System wurde erstmals ein inhibitorischer Antikörper gegen die TSLPR α -Kette angewendet. Im OVA-induzierten Asthma-Mausmodell konnte dadurch das Zytokinlevel (verringerte Expression IL-4, IL-5 und erhöhte Expression IL-10 und IFN γ) eher in Richtung der TH₁-Antwort verschoben werden, gleichzeitig konnte die Gesamtzellzahl in der untersuchten BAL (bronchoalveoläre Lavage), besonders die Anzahl der eingewanderten Eosinophilen und Lymphozyten verringert werden. Dies geht einher mit der Verringerung der Anzahl von schleimproduzierenden Becherzellen und daraus folgend auch der Schleimproduktion. Auf zellulärer Ebene wird die Aktivierung und Reifung von Dendritischen Zellen sowie deren Migration in die Lymphknoten inhibiert, was in einer verringerten TH₂-Antwort resultiert. Der Einsatz eines inhibitorischen Antikörpers kann somit die Schwere der asthmatischen Reaktion mildern ([131]). Ein Antikörper gegen TSLP ist im OVA- und im Allergen-induzierbaren Mausmodell in der Lage, die Expression von TSLP selber, sowie die Expression von DC-typischen Reifungs- und Aktivierungsmarkern (CD80, CD40, CD86) auf DCs herunter zu regulieren. Ebenso waren die Levels von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-13 in BAL-Flüssigkeiten, sowie im Gesamten die Schwere der asthmatisch-entzündlichen Symptome deutlich reduziert ([85], [27]). Zur Blockade des TSLP und seines Rezeptors im humanen System sind ebenfalls Antikörper generiert und charakterisiert worden. So kann der Antikörper 1E10, gerichtet gegen die humane TSLPR α -Rezeptorkette, in BaF3-Zellen, welche den humanen TSLP-Rezeptor stabil exprimieren, die Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5 auf Phosphorylierungs- und transkriptionaler Ebene inhibieren ([17]). Oxelumab, ein Antikörper der Firma Roche gegen den murinen Ox40L, konnte im OVA-induzierten Mausmodell die TSLP-induzierte Entzündung der Lunge und Haut deutlich reduzieren, die humane Variante des Antikörpers erzielte vergleichbare Ergebnisse in Tierversuchen mit Primaten. Durch den Antikörper wird die OX40-OX40L-Interaktion blockiert und gleichzeitig die Anzahl aktivierter DCs verringert ([128]). Zwischenzeitlich wurde aber von Roche ohne Nennung von Gründen die Einstellung der klinischen Phase-II-Studie bekannt gegeben. Zusätzlich halten oder beantragen verschiedene Firmen (Amgen Inc., Shering Corp., Tanox Inc., Novartis) Patente, welche sich mit dem Gebrauch von Antagonisten gegen TSLP oder den TSLP-Rezeptor beschäftigen ([38]). Außer zu Amgen's Antikörper AMG 157, einem vollständig humanisierten, monoklonalen Antikörper, welcher sich bereits in der Phase I der klinischen Studien befindet, in welchen das Potential des Antikörpers untersucht wird, Asthma zu behandeln, wurden zu den vorliegenden Patenten noch keine Ergebnisse aus vorklinischen oder klinischen Studien veröffentlicht ([118]). Neben der Anwendung von Antikörpern gibt es auch Ansätze die Verfügbarkeit der Zytokine

im System zu verringern. TSLP-induzierte Effekte ließen sich im Mausmodell in vivo durch ein Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne der murinen TSLP α -Kette und dem Fc-Teil des IgG2a-Antikörpers reduzieren. Durch die Bindung von freiem TSLP verringerte sich die Oberflächenexpression verschiedener co-stimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 auf TSLP-CDs und DCs der Lunge signifikant. Gleichzeitig wurde in BAL-Flüssigkeiten eine verringerte Gesamt-Zellzahl gemessen, einhergehend mit verringerten Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-5 sowie einer erhöhten Konzentration des TH₁-Zytokins IFN γ . ([161]).

1.4 Zielsetzung

Zytokine, Zytokinrezeptoren und deren Interaktionen spielen eine große Rolle in vielen pathophysiologischen Prozessen. Am Beispiel des Zytokins TSLP und seinem spezifischem Rezeptor TSLPR sollen grundlegende Ansätze aufgezeigt werden, diese Prozesse zu erforschen und therapeutisch zu beeinflussen.

TSLP wird als Schlüsselprotein im allergisch-entzündlichen Geschehen bei der Aktivierung des Immunsystems nach Allergen-Kontakt definiert, inzwischen wird ihm auch eine große Rolle in verschiedenen Krebserkrankungen zugesprochen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll durch das Auffinden weiterer Signalwege und Zielgene zunächst ein Beitrag zum besseren Verständnis der Signaltransduktion des TSLP-Rezeptors geleistet werden. Bisherige Daten zur Signaltransduktion des murinen und des humanen TSLP-Rezeptors weisen auf Unterschiede bei den rekrutierten Signalmolekülen innerhalb der Signalkaskade hin. Durch den Vergleich der TSLP-induzierten Signale des humanen und des murinen Rezeptors soll herausgefunden werden, inwieweit sich Daten aus Mausmodellen auf das humane System übertragen lassen.

Anhand von Erkenntnissen verwandter Zytokinen soll untersucht werden, auf welchem Wege sich eine antagonistische Variante des humanen TSLP generieren lässt, um einen Einfluss auf die TSLP-induzierten Signale ermöglichen. Die Voraussetzung für eine solche Mutante wäre die Bindung des Rezeptors ohne dessen darauffolgende Aktivierung.

Aufbauend auf den Erkenntnissen zu den TSLP-induzierten Signalwegen ist es möglich, auf der Basis der intrazellulären Domäne des TSLP-Rezeptors Hybridrezeptoren zu generieren, welche durch den Austausch der extrazellulären Domänen an neue Liganden adaptiert werden können. Ihre Anwendung finden dieser Rezeptoren bei der Bestimmung der biologischer Aktivität neuer Liganden. An Beispielen aus den verschiedenen Rezeptorfamilien (Zytokin-Rezeptoren, Rezeptortyrosinkinasen, Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren) sollen die chimären Rezeptoren außerdem zur Charakterisierung von neuen Antagonisten und Agonisten von therapeutisch relevanten Rezeptor-Liganden-Komplexen angewendet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme und Medien

Für Klonierungsarbeiten und zur Plasmidamplifikation wird der *E. coli*-Stamm Top10 (Novagen) verwendet. Für die Experimente des Bakteriendisplay wird der *E.coli*-Stamm BMH 71/38 verwendet. Die Expression rekombinanter Proteine erfolgt im *E.coli*-Stamm BL21(De3) von New England Biolabs (NEB). Für die Kultivierung von allen Bakterienstämmen wurde LB-Medium (1,0 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1,0 % NaCl in ddH₂O pH 7,5) verwendet. Für die Herstellung von Agar-Platten wurde dem LB-Medium 1,5 % Agar zugefügt. Alle Medien wurden vor Verwendung bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Für Selektivmedien wurden zum LB-Medium bzw. zu der noch warmen LB-Agar-Lösung 100 µg/ml Ampicillin bzw. 34 µg/ml Chloramphenicol gegeben.

2.1.2 Eukaryotische Zellen und Medien

Die verwendeten Zelllinien und entsprechende Medien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Zelllinie	Beschreibung	Medium
BaF3	nicht adhärent wachsende murine pro-B-Zelllinie, aus dem Knochenmark der BALB/c-Maus etabliert ([107]), benötigt zur Proliferation murines IL-3, Verdopplungszeit 24h	RFG-mIL-3: 90 % RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % Gentamycin + mIL-3 (5 % Überstand, siehe Kapitel 2.1.3)
BaF3-TSLPR	siehe BA/F3, exprimiert den TSLP-Rezeptor dauerhaft auf der Zelloberfläche, Proliferation nur nach Zugabe von TSLP	RFG-TSLP: 90 % RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % Gentamycin + 10 ng/ml hTSLP
Hybridoma-Kulturen	Antikörper-produzierende Zellen, generiert als Fusion aus murinen B-Zellen und Myelomazellen	RFG-IL-6: 90 % RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % Gentamycin + 20 ng/ml IL-6
X63Ag8-653BPV-mIL3	Myelomzelllinie, sezerniert mIL-3 in das Kulturmedium	RFG: 90 % RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % Gentamycin

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien und Kulturmedien

2.1.3 Zytokine

Die rekombinanten Zytokine rhTSLP, hNGF- β , hIL-13, TGF β -1, TGF β -2, TGF β -3, BMP-2, PDGF α , mM-CSF, hM-CSF, hIL-4, hIL-6, hGM-CSF und mIL-3 wurden als 10 μ g Lyophilisat von der Firma Immunotools GmbH zur Verfügung gestellt.

mTSLP: 10 μ g Lyophilisat, Peprotech

mIL-3: gewonnen aus der murinen Hybridoma-Zelllinie X63Ag8-653BPV-mIL-3, wird ins Kulturmedium sezerniert

2.1.4 Plasmide

Basisvektor für die Klonierung und Expression von Rezeptoren war das Konstrukt pcDNA3.1 (Firma Invitrogen). Die Klonierung von Reportergenkonstrukten erfolgte mit dem Basisvektor pGL4.26-luc (Firma Promega). Die rekombinante Expression von Zytokinen erfolgte in dem Expressionskonstrukt pRSet-5b (Invitrogen). Im Kontext des Bakteriendisplay wurden die Proteine im Expressionsplasmid pASKIEP exprimiert. Dieses Plasmid ist eine modifizierte Variante des Plasmides pASK, welches zusätzlich die Fusion des Zielproteins an das bakterielle Protein Intimin (I) erlaubt und zur Detektion die Sequenz für einen E-Tag (E) und einen P5D4-Tag (P) trägt. Die Plasmidkarten für diese Vektoren sind angehängt (siehe Anhang, Kapitel 6.3, Seite XIV), weitere verwendete Plasmide sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Plasmid	Beschreibung
pGL3-IRF1-luc	Luciferase-Reportergenplasmid für Stat1, die Chloramphenicol-Acetyltransferase-codierende Sequenz des pGL3-Plasmids wurde durch 2 Stat1-Bindungsstellen des IRF-Promotors ersetzt ([47])
pGL3-SOCS3-luc	Luciferase-Reportergenplasmid für Stat3, eingebracht wurde der Stat3-assoziierte murine Promotor für SOCS3 (zur Verfügung gestellt von Fred Schaper, Uni Aachen)
p(Stat5-RE) ₆ -luc	Luciferase-Reportergenplasmid, welches sechs Stat5-Response-Elemente enthält, gekoppelt an ein Luciferasereportergen (Laborbestand K. Friedrich, Jena) ([96])
pOSM-luc	Luciferase-Reportergenplasmid für Stat5-abhängige Reportergen-Expression mit Promotor von murinem <i>osm</i> -Gen (Oncostatin M) ([160]); (von A. Miyajima via R. Moriggl)
pCIS-lucA	Luciferase-Reportergenplasmid für Stat5-abhängige Reportergen-Expression mit Promotor von murinem <i>CIS</i> -Gen; (von A. Miyajima via R. Moriggl)
pBAT-TM	Plasmidkonstrukt, codiert die Information für die Expression des chimären Trk/Met-Rezeptors auf der Zelloberfläche ([33])
pcDNA3.1-13/4	Plasmid zur Expression des chimären Rezeptors 13R α 1/4R α ([12]). Dieses Konstrukt ist die Basis für die Klonierung sämtlicher Hybridrezeptoren. Es besitzt einen n-terminalen P5D4-Tag zum Expressionsnachweis sowie das Signalpeptid der IL-4R α -Kette
pcDNA3.1-4/ γ c	Plasmid zur Expression des chimären Rezeptors 4R α / γ c ([12]).

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

2.1.5 Primer

Die für die Klonierungen verwendeten Primer sind in Tabelle 4 (Anhang, Kapitel 6.1, Seite IX) dargestellt. Alle Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen. Die Sequenz der Primer ist immer in 5'-3'-Richtung angegeben, unterstrichen sind die Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme. Mutationsstellen mit von der Originalsequenz abweichenden Bereichen sind in **blau** dargestellt. Zu den Referenzsequenzen komplementäre Nukleotide sind in Großbuchstaben angegeben. Abkürzungen: rev - *reverse*-Primer, for - *forward*-Primer. Die GenBank-Zugangsnummern der Referenzsequenzen für das Primerdesign sind in Tabelle 5 (Anhang, Kapitel 6.2, Seite XIII) dargestellt.

2.1.6 Antikörper

Die in dieser Arbeit eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Epitop	Spezies	Hersteller
P5D4	5 µg/ml (Zytometrie) 2 µg/ml (WB) 1 µg/Probe (FACS)	P5D4 – Epitop	Maus, mAb	Laborbestand K. Friedrich, Jena
Anti-Stat5 (H-134)	1:1000 (WB)	STAT5α-C-Terminus	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology
Anti-phospho- Tyr-694-Stat5	1:1000 (WB)	Phospho-Stat5 (Tyr 694)	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
Anti-Stat3 (H-190)	1:1000 (WB)	Stat3 (H-190)	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology
Anti-phospho- Tyr-705-Stat3	1:1000 (WB)	Phospho-Stat3 (Tyr 705)	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
Anti-phospho- Tyr-701-Stat1	1:1000 (WB)	Phospho-Stat1 (Tyr 701)	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Stat1	1:1000 (WB)	Stat1-C-Terminus	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology
Anti-phospho- Tyr-1007/ 1008-Jak2	1:1000 (WB)	Phospho-Jak2 (Tyr 1007/1008)	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
Anti-Jak2	1:1000 (WB)	Jak2-C-Terminus	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
Anti-phospho- Tyr-1022/ 1023-Jak1	1:1000 (WB)	Phospho-Jak1 (Tyr 1022/1023)	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
Anti-Jak1	1:1000 (WB)	Cys775 -umgebende Reste	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
Protein A-Beads		Rabbit IgG	Kaninchen	Sigma-Aldrich

Tabelle 3: Verwendete Antikörper (Fortsetzung)

Bezeichnung	Verdünnung	Epitop	Spezies	Hersteller
Protein A-Beads		Rabbit IgG	Kaninchen	Sigma-Aldrich
Anti-Maus IgG Agarose-Beads		Maus IgG	Ziege	Sigma-Aldrich
Anti-Kaninchen-IgG-HRP	1: 10000 (WB)	Kaninchen IgG	Ziege IgG HRP-gekoppelt	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Maus-IgG-HRP	1: 10000 (WB)	Maus IgG	Maus IgG HRP-gekoppelt	Santa Cruz Biotechnology
CD11c-PE	1:100 (FACS)	Humanes CD11c, DC-Marker	Maus IgG	Immunotools
CD14-APC	1:100 (FACS)	Humanes CD14, Monozyten-Marker	Maus IgG	Immunotools
Anti-Mouse- (PE/FITC)	1:100 (FACS)	Maus-IgG	Kaninchen IgG	Immunotools
Ox40L-APC	1:100 (FACS)	Humaner Ox40L, Marker auf DCs	Maus IgG	BD Biosciences
CD127-APC	1:100 (FACS)	Humanes CD127, IL-7Ra-Kette	Maus IgG	R&D Systems

2.1.7 Chemikalien / Feinchemikalien / Kits

Acrylamid, Rotiphorese Gel 40	Carl Roth GmbH & Co.
Agarose	Biozym
Agar Kobe I	Carl Roth GmbH & Co.
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co.
Cell Titer Glo®	Promega
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific
DMEM	Sigma
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DNA-Marker Generuler 1 kb Plus	Fermentas

dNTPs	Fermentas
ECL-Kit	Perkin Elmer Life Sciences
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co.
Ficoll Biocoll	Biochrom
FKS	PAA Laboratories GmbH
Gentamycin	Gibco BRL
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co.
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co.
Injektionswasser	Braun
JAK-Inhibitor I InSolution P6	Calbiochem
Lumi-Light ECL Substrate	Roche Diagnostics GmbH
Methanol	Carl Roth GmbH & Co.
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co.
NaCl	Carl Roth GmbH & Co.
NP-40	Serva Electrophoresis GmbH
Nucleobond Xtra-Midi	Macherey-Nagel
NucleoSpin Gel & PCR Cleanup	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid Quickpure	Macherey-Nagel
Proteaseinhibitor complete Mini	Roche Diagnostics GmbH
PBS	Sigma
Phosphataseinhibitor complete Mini	Roche Diagnostics GmbH
Phusion-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Proteinmarker PageRuler	Thermo Fisher Scientific
5-Prime MasterMix	5-Prime
Restriktionsenzyme Fast Digest®	Thermo Fisher Scientific
Roti-Quant® Bradford Reagenz	Carl Roth GmbH & Co.
Rotisafe	Carl Roth GmbH & Co.
RPMI 1640 w Glutamine	Sigma
SDS	Serva Feinbiochemica GmbH & Co.
Sephacrose (Q- / CM-) Fastflow	GE Healthcare
T4-Ligase	Fermentas
TEMED	Serva Electrophoresis GmbH
Tris	Carl Roth GmbH & Co.
Trypanblau	Merck KGaA
Trypsin-EDTA (1 x)	Biochrom AG
Tween-20	Carl Roth GmbH & Co.

2.1.8 Geräte und Materialien

Amaya-Nukleofektor I	AMAXA GmbH, jetzt LONZA
Mikroplatten-Luminometer	Glomax (Promega)
Spektro-Photometer	Nano-Drop (PeqLab)
WB Detektor G-Box	Syngene (VWR)
Blaulichttisch	BioView (BioStep)
UV-Lichttisch	Fluo-Link (Biometra)
Mikroplattenreader	Sunrise (TECAN)
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135M (Carl Zeiss Jena)
Durchlichtmikroskop	AF21 (MOTIC)
Sterilwerkbank	NUAIRE (IBS Integra Biosciences)
CO ₂ -Inkubator	NUAIRE (IBS Integra Biosciences)
Zellzentrifuge	MF48 (AWEL centrifugation)
Tischzentrifuge	5415 R (Eppendorf)
Falcon-Zentrifuge	Rotina 420R (Hettich Zentrifugen)
Tischwaage	TE412 (Satorius)
Feinwaage	Satorius
Bakterienschüttler	Infors HAT (Infors AG CH)
Bakterienbrutschrank	Incu-Line (VWR)
Thermocycler	2720 (Applied Biosystems)
Chromatographie-Anlage	Äkta Purifier (GE Healthcare)
Homogenisator	Panda Plus 1000 (GEA Niro Soavi)
Kulturgefäße: 17,5 ml-, 250 ml-, 1000 ml-	
Kulturflaschen für Suspensionskulturen	Greiner BioOne
6-, 12-, 96-Well-Platten	Greiner BioOne
Plastikröhrchen, steril: 15ml, 50 ml	Greiner BioOne
Reaktionsgefäße: 0,5ml, 1 ml, 2 ml	Sarstedt

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Herstellung chemokompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Ein 500 ml-Schikanekolben mit 200 ml LB und 20 mM MgSO_4 wird mit 100 μl einer Vorkultur inokuliert, diese wurde am Tag zuvor angesetzt (5 ml-Vorkultur (LB + 20 mM MgSO_4)). Die Bakterienkultur wird bei 37 °C und 160 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,1-0,3 angezogen. Anschließend wird die Kultur auf vier 50 ml-Röhrchen aufgeteilt und diese für 10 min bei C und 4000 rpm zentrifugiert. Die Pellets werden in 20 ml eiskaltem TfbI vorsichtig aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4 °C, 10 min, 4000 rpm) werden die Pellets in 4 ml eiskaltem TfbII vereinigt, zu je 100 μl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

TfbI-Puffer: 50 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$; 100 mM KCl; 10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$;
30 mM KAcetat; 15% Glycerin; pH 6,1

TfbII-Puffer: 10 mM MOPS; 75 mM CaCl_2 ; 100 mM KCl; 15% Glycerin; pH 7,0

2.2.2 Transformation von kompetenten *Escherichia coli*-Zellen

Die Transformation von Plasmiden zu ihrer Amplifikation erfolgt in den oben beschriebenen chemokompetenten *E.coli*-Zellen. 100 μl Zellen werden langsam auf Eis aufgetaut und 0,1-1 μg Plasmid-DNA oder 10 μl Ligationsansatz dazugegeben. Nach 10 min Inkubation des Ansatzes auf Eis wird der Ansatz für 1 min einem Hitzeimpuls im 42 °C warmen Wasserbad ausgesetzt. Nach weiteren 15 min auf Eis erfolgt die Zugabe von 1 ml LB-Medium und die Inkubation der Suspension für 45-60 min im Schüttler bei 37 °C, dabei sollte das auf dem Plasmid zur Selektion befindliche Resistenzgen exprimiert werden. Die Zellsuspension wird im Anschluss 3 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt, das Pellet in 100 μl LB-Medium resuspendiert. Im Anschluss wird die Zellsuspension auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*-Zellen

Aus den transformierten, auf Agarplatten gewachsenen *E.coli*-Zellkolonien wird eine 5 ml Vorkultur angesetzt. Aus dieser Kultur entnimmt man 150 μl und überführt sie in einen 500 ml-Schüttelkolben, mit ca. 150 ml LB-Medium und 150 μl Ampicillin (Konzentration 100 mg/ml). Diese Hauptkultur wird über Nacht im Schüttelschrank bei 37 °C inkubiert. Die Plasmidisolierung aus Hauptkulturen wird für Midi-Präparationen (bis zu 200 ml Bakterienkultur) mit dem Kit Nucleobond Xtra Midi und für Mini-Präparationen (bis zu 5 ml Bakterienkultur) mit dem Kit NucleoSpin Plasmid Quickpure (beide Macherey-Nagel) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Plasmide werden in destilliertem Wasser aufgenommen. Zur dauerhaften Lagerung wird die Plasmid-DNA bei –20 °C aufbewahrt.

2.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgt an einem UV-Spektrometer (Firma Peqlab, Nano-Drop). Dazu werden 2 µl der Probe entnommen und photometrisch bei 280 nm gemessen. Destilliertes Wasser dient dem Nullabgleich.

2.2.5 Restriktion von Plasmiden

Zur Restriktion von Plasmid-DNA werden stets die Restriktionsenzyme der Reihe Fast-Digest (ThermoFisher) verwendet und nach Herstellerprotokoll eingesetzt. Die Inkubationszeit wird mit 5 min für 1 µg DNA angesetzt, für präparative Verdaus werden jeweils 3 µg Plasmid-DNA verdaut und die Restriktionszeit und die Enzymmenge entsprechend erhöht. Der Verdau findet bei 37 °C statt.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines Agarosegels wird je nach Anforderung zwischen 0,6 % und 2 % Agarose eingewogen und in 50 ml TAE-Puffer (50x TAE-Puffer (pH 8,0): 2 M TRIS 5,7% [v/v] Essigsäure 50 mM EDTA) unter Erhitzen aufgelöst und in eine Elektrophorese-Gelkammer gegossen. Zum Anfärben der DNA wird der Farbstoff RotiSafe (Carl Roth GmbH & Co.) 1:30000 zu der Agaroselösung hinzugegeben. Nach Polymerisation des Gels wird die Kammer mit TAE-Puffer gefüllt, die DNA-Proben mit Ladepuffer (6x DNA-Ladepuffer: 0,9 g/l Bromphenolblau 60% [v/v] Glycerol 60 mM EDTA) versetzt und in die Taschen pipettiert. Es wird für 15 min eine Spannung von ca. 100 V angelegt und das Gel anschließend unter UV-Licht detektiert (UV-Analysegerät VWR).

2.2.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Mit dieser Methode werden PCR-Produkte oder verdaute Plasmide und Inserts nach der elektrophoretischen Auftrennung zur weiteren Verwendung aus dem Agarosegel isoliert. Stark sichtbare Banden können direkt auf dem Blaulichttisch ausgeschnitten werden. Für schwächere Banden, welche nur auf dem UV-Tisch sichtbar gemacht werden können, muss zur weiteren Verarbeitung die Beschädigung der DNA durch UV-Licht ausgeschlossen werden. 80% der Gelbanden werden dazu vertikal herausgeschnitten und beiseite gelegt. Das restliche Gel wird unter UV-Licht betrachtet und die Zielbanden mit einem Skalpell markiert. Danach werden die herausgeschnittenen Gelbanden wieder eingelegt und das Zielprodukt anhand der Markierungen ausgeschnitten. Die Isolierung aus dem Agarosegel erfolgt mit dem Kit NucleoSpin PCR Clean Up (Macherey & Nagel) nach Herstellerangaben.

2.2.8 Ligation

Zur Ligation werden ca. 50 ng Plasmid und 250 ng zu ligierender DNA mit 1 U T4-Ligase in einem gepufferten Reaktionsvolumen von 20 µl über Nacht bei RT inkubiert und anschließend in *E.coli* transformiert.

2.2.9 PCR-Techniken

Screening von Transformanten / Kolonie-PCR

Diese Variante der PCR wird verwendet, um Bakterienklone dahingehend zu überprüfen ob das aufgenommene Plasmid die gewünschte DNA-Sequenz durch Ligation erfolgreich eingebaut hat. Die Bakterienklone werden dazu zunächst gepickt und in 24-Well-Platten in 1 ml LB-Medium mit Antibiotika für ca. 3 h bei 37 °C inkubiert. 1 µl der Bakteriensuspension wird zu dem PCR-Ansatz gegeben. Es wurde der Fertig-Mastermix der Firma 5-Prime nach Herstellerangaben verwendet. Als Positivkontrolle wird cDNA oder DNA, welche das nachzuweisende Insert enthält, verwendet. Der Mastermix beinhaltet Taq-Polymerase, als Primer werden die spezifischen Primer für das Insert verwendet.

Präparative PCR

Die präparative PCR wird zur Amplifikation und Klonierung von DNA-Fragmenten verwendet. Diese können anschließend in Plasmide oder andere DNA-Fragmente eingebaut werden. Über spezifisches Primerdesign können bestimmte zu klonierenden Bereiche definiert werden und durch Einbringen von geeigneten Schnittstellen mit Plasmiden verknüpft werden. Aufgrund ihrer 50-fach höheren Genauigkeit bei der Replikation gegenüber der Taq-Polymerase wurde dafür ausschließlich die PhusionII-Hot-Start-DNA-Polymerase der Firma Finnzymes verwendet. Die Verwendung erfolgte nach Herstellerprotokoll.

Mutagenese-PCR

Zum Einbringen einer Mutation an einer bestimmten Stelle in der Proteinsequenz soll die Basensequenz an der entsprechenden Stelle in der Plasmid-DNA so verändert werden, dass ein Aminosäure-Austausch erfolgt (site-directed-mutagenesis PCR). Erfolgt der Austausch im n-terminalen oder c-terminalen Ende der Basensequenz, kann diese einfach durch Änderung der Basen im verwendeten *forward*- oder *reverse*-Primer realisiert werden. Befindet sich die zu verändernde Region im mittleren Bereich der Sequenz, werden zusätzlich zu den *forward*- und *reverse*-Primern des Volllängenproteins zwei weitere Primer benötigt. Diese binden als *forward*- oder *reverse*-Primer genau im Bereich der Mutation und besitzen die Sequenz der Zielmutation. Es wird eine zweischrittige PCR durchgeführt, bei der die Sequenz des wildtypischen Proteins als Template verwendet wird. Im ersten Schritt werden zwei PCR-Produkte amplifiziert, sie bestehen aus dem n-terminalen Bereich des Proteins bis zur eingebauten Mutation, bzw. aus dem c-terminalen Bereich des Proteins ab der Mutation. Die beiden Fragmente werden aufgereinigt und unter Verwendung des *forward*- und *reverse*-Primers des Volllängenproteins im zweiten PCR-Schritt verknüpft. Es entsteht das vollständige mutierte Protein als PCR-Produkt, dieses wird über Restriktion in das Plasmid eingebaut und ersetzt dort die wildtypische Sequenz.

2.2.10 DNA-Sequenzierung

Der Erfolg sämtlicher Klonierungs- und Restriktionschritte wird mittels Sequenzierung überprüft. Hierzu werden in der Kolonie-PCR positive Klone durch Plasmidpräparation im

Mini-Maßstab (1 ml Bakteriensuspension, siehe Kapitel Plasmidaufreinigung) über Säulen aufgereinigt. Die aufgereinigten Plasmide werden von der Firma GATC Biotech mit einem optimierten Protokoll der Sequenzierung nach Sanger in der Region des Inserts unter Verwendung flankierender Primer (zur Verfügung gestellt von der Firma GATC Biotech) sequenziell analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem im Internet frei zugänglichen Programm APE (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>).

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung und Passagierung von Zellen

Die verwendeten Zellen werden in Zellkulturflaschen (25 cm² oder 75 cm² je nach Bedarf an Zellen) im Kompletmedium steril kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgt in einem CO₂-Begasungsbrutschrank für Zell- und Gewebekulturen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchte. Die BA/F3- und die BA/F3-TSLPR-Zellen sind Suspensionszellen. Bei einer Zelldichte von ca. 1,5-2*10⁶ Zellen/ml werden sie durch Mediumwechsel und Abnahme von Zellen auf eine Zelldichte von ca. 1,5-2*10⁵ Zellen/ml verdünnt. Bei einer Verdopplungszeit von ca. 20-24 h ist dies alle 3-4 Tage nötig. Zur Kultivierung wird den Zellen 10 ng/ml mIL-3 (BaF3-Zellen) oder 10 ng/ml hTSLP (BaF3-TSLPR-Zellen) zugegeben.

Bei den COS7- und den HEK293T-Zellen handelt es sich um adhärenz wachsende Zellen, sie müssen vor dem Splitten durch Zugabe von 1 ml (Kulturflasche 25 cm²) oder 5 ml (Kulturflasche 75 cm²) Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst werden. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion wird in gleicher Menge Kulturmedium hinzu gegeben, das darin enthaltene FKS stoppt die Reaktion. Danach erfolgt die Verdünnung wie oben beschrieben.

Um Zellen vom Medium zu trennen, werden sie bei 1000 rpm für 4 min abzentrifugiert, anschließend mehrfach mit PBS (0,137 M NaCl; 2,7 mM KCl; 23 mM Na₂HPO₄-H₂O; 1,75 mM KH₂PO₄; pH 7,2) gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach können sie in frischem oder verändertem Medium aufgenommen werden.

Bei den Antikörper-produzierenden Hybridom-Zellen handelt es sich ebenfalls um Suspensionszellen, die Kultivierung erfolgt entsprechend der von BA/F3-Zellen, dem RFG-Medium wird zusätzlich 10 ng/ml hIL-6 zugegeben.

2.3.2 Inkulturnahme und Kryokonservierung von Zellen

Im flüssigen Stickstoff konservierte Kulturen werden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in entsprechendes Medium gegeben und schnellstmöglich durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 4 min vom Einfriermedium getrennt. Nach mehreren Waschgängen mit ihrem Medium können die Zellen in Kulturflaschen aufgenommen werden. Um Kulturen einzufrieren und auf Dauer zu konservieren, werden ca. 2 Mio. Zellen/ml in Einfriermedium (90 % DMSO + 10 % FKS, oder abweichend nach Vorschriften der DSMZ) aufgenommen. Die Suspension wird zu je 1 ml auf sterile Kryoröhrchen verteilt und bei -80 °C eingefroren. Nach 3-14 Tagen können die Röhrchen zur dauerhaften Lagerung in den Stickstofftank (-192 °C) überführt werden.

2.3.3 Bestimmung der Zellzahl einer Kultur

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgt nach Vitalfärbung mit Trypanblau (4 %) durch Auszählen in einer Zählkammer (Neubauer). Trypanblau kann nur von toten Zellen aufgenommen werden und färbt diese blau. Die Zellzahl pro ml Medium ermittelt sich auf gezählter Zellzahl, multipliziert mit dem Kammerfaktor (10^4) und dem Verdünnungsfaktor.

2.3.4 Stimulation von Zellen für Western Blots

Um den von Zytokinen ausgelösten Signalweg in BaF3-Zellen zu untersuchen, werden stimulierte mit unstimulierten Zellen (stimuliert mit Wachstumsfaktor) verglichen. Dazu werden die Zellen für 6 h starviert, also in RFG-Medium ohne Wachstumsfaktoren ‚gehungert‘. Pro Stimulationsansatz werden ca. $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in 6-Well-Platten eingesät. Danach erfolgt die Zugabe der Wachstumsfaktoren. Damit werden die Zellen für unterschiedliche Zeiträume mit den zu untersuchenden Zytokinen stimuliert. Es wird zusätzliche eine Negativkontrolle angesetzt, dabei befinden sich die Zellen in normalem RFG-Medium, ohne zugesetzte Wachstumsfaktoren. Als Positivkontrolle dient als Wachstumsfaktor zugesetztes mIL-3, bei Stimulation der Zellen mit diesem Wachstumsfaktor ist der Signalweg bekannt und vergleichbar.

2.3.5 Transiente Transfektion von Zellen

Diese Variante der Transfektion beruht auf der Elektroporation und ist ein von der Firma Amaxa GmbH Köln (jetzt LONZA) entwickeltes Verfahren. Sie erfolgt in dem Nucleofector I (AMAXA GmbH) in einem vom Hersteller entwickelten Medium. Die Einstellungen am Nukleofektionsgerät und die Wahl des Mediums kann bei diesem Protokoll für die jeweilige Zelllinie optimiert werden, wodurch hohe Transfektionseffizienzen bei hoher Zellvitalität erzielt werden können. In Vorversuchen wurde mit BA/F3-Zellen die beste Transfektionseffizienz mit dem Transfektionsreagenz V und dem Programm T16 erreicht.

Für jeden geplanten Transfektionsansatz zentrifugiert man 5-6 Mio. Zellen ab und nimmt diese nach 2 Waschgängen mit PBS in 100 µl Transfektionsreagenz V auf. Nach Zugabe von jeweils 5 µg des zu transfizierenden Plasmids (bei Plasmidkombinationen aus Rezeptor- und Reporterkonstrukten werden 5 µg Gesamt-DNA eingesetzt) verteilt man die Ansätze auf die vom Hersteller (AMAXA GmbH) bereitgestellten Elektroporationsküvetten. Es erfolgt die Transfektion in diesen Küvetten mit dem oben genannten Programm. Die transfizierten Zellen werden in die benötigte Menge RFG-Medium gegeben. Zur Analyse der Expression von Rezeptoren auf der Zelloberfläche werden die Zellen in 6-Well-Platten unter Zugaben von mIL-3 über Nacht kultiviert und anschließend für die zytometrische Analyse vorbereitet. Für Reporter-genversuche werden die Zellen zu $1 \cdot 10^5$ Zellen/Well in 100 µl RFG-Medium ausgesät und je nach Versuch stimuliert. Die Inkubation erfolgt nach Standardprotokoll für ca. 16 h.

2.3.6 Stabile Transfektion von Rezeptorketten

Ungefähr 24-48 h nach der Transfektion von Rezeptoren ist deren Expression auf der Zelloberfläche nicht mehr nachweisbar. Das transfizierte Plasmid wird nicht mit repliziert,

teilende Zellen geben das Plasmid nicht weiter an die Tochterzellen und es wird als Fremd-DNA in der Zellen abgebaut. Um eine dauerhafte Expression des Plasmides zu erreichen, werden exprimierende Zellen selektioniert. Dies geschieht durch dauerhafte Kultivierung der Zellen nach Transfektion unter Zugabe eines Selektionsmarkers, z.B. Neomycin oder Zeomycin. Gegen dieses Antibiotikum sind die Zellen resistent, wenn z.B. das Plasmid pcDNA3.1 eingebaut wird, über welches die genetische Information für die Resistenz vermittelt wird. In BaF3-Zellen kann auf die Expression eines Rezeptors selektioniert werden, in dem das essentielle Proliferationssignal durch den eingebrachten Rezeptor und seinen spezifischen Liganden erzeugt wird. BaF3-Zellen werden dafür mit den Expressionskonstrukten eines funktionalen Rezeptors transfiziert und in Gegenwart des spezifischen Liganden über mehrere Wochen kultiviert. Dabei sterben die Zellen ab, welche die Rezeptoren nicht auf der Oberfläche exprimieren und es überleben nur diese, welche die Plasmid-DNA stabil in ihr Genom integrieren konnten.

2.3.7 Einfacher und Dualer Luciferase-Reporterassay

In dem Dualen Luciferase-Reporterassay wird die zytokininduzierte Hochregulierung der Luciferase-Expression anhand der verwendeten Reporter-Konstrukte ermittelt. Für die Nachweisreaktion des gebildeten Enzyms wird das "Dual Luciferase Reporter (DLRTM) Assay System" der Firma Promega verwendet. Bei diesem System wird simultan die Expression zweier individueller Reporterenzyme innerhalb eines einzelnen Systems gemessen. Typischerweise ist das „experimentelle“ Reporter-Konstrukt an den Effekt spezifischer experimenteller Bedingungen gekoppelt, während die Aktivität des ko-transfizierten Reporter-Konstrukts eine Kontrolle zur Verfügung stellt, die als Grundaktivität dient. Dadurch werden experimentelle Differenzen, die z. B. durch unterschiedliche Transfektionseffizienzen herbeigeführt werden können, normiert. Bei dem „DLRTM-Assay“ wird die Aktivität der Firefly- (*Photinus pyralis*) und der Renilla- (*Renilla reniformis*) Luciferase sequentiell innerhalb derselben Probe gemessen. Zur Vorbereitung des Assays werden die Zellen zunächst abzentrifugiert, mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend mit „Passive Lyse Buffer“ aufgeschlossen. Die Intensität der Lumineszenz (LU) der Firefly-Luciferase wird zuerst durch Zugabe des „Luciferase Assay Reagent II“ (LAR II) gemessen, um ein stabiles Lumineszenzsignal zu erhalten. Danach wird die Reaktion durch Zugabe des „Stop & Glo“ Reagen in dasselbe Well gequenchet (ausgelöscht) und die Renilla-Luciferase-Reaktion simultan initiiert. Im Anschluss kann die Renilla-Luciferaseaktivität gemessen werden. Dabei wandelt die exprimierte Luciferase (*Firefly*- oder *Renilla*-Luciferase) das vorliegende Luciferin in Oxyluciferin um, wodurch Licht entsteht. Die Intensität der Lumineszenz (LU) ist proportional zur exprimierten Luciferasemenge ([154]) und kann nach Abschluss der Messung beider Luciferasekonstrukte quantifiziert werden, indem die Daten der *Firefly*-Luciferaseaktivität durch die Daten der *Renilla*-Luciferaseaktivität geteilt werden. Ein Vergleich der gemessenen Intensitäten liefert somit ein Maß für die Stimulierbarkeit eines Reporter-Konstrukts durch die unterschiedlichen Zytokine. Als besondere Größe kann daraus der Stimulationsindex (SI) abgeleitet werden, der aus dem Verhältnis der resultierenden Lumineszenzen von stimulierten zu unstimulierten Zellen in Bezug auf ein bestimmtes Zytokin gebildet wird. Ist für das Ergebnis die Transfektionseffizienz nicht relevant

oder ein Vergleich mit anderen Transfektionen nicht möglich oder nötig, reicht es aus, einen Einfachen Luciferase-Reporterassay durchzuführen. Dabei ist die Transfektion des *Renilla*-Kontrollplasmids nicht nötig, zur Messung der Luciferaseaktivität wird daher nur das „Luciferase Assay Reagent I“ (LAR I) zugegeben. Eine zweite Messung auf *Renilla*-Aktivität entfällt. Die Messung und Injektion der Substrate erfolgt am Gerät Glomax (Promega).

2.3.8 Proliferationsassay

Die Proliferationstests mit den stabilen BaF3-Zellen erfolgen in einer 96-Well-Platte mit einer colorimetrischen Methode. Pro Well werden $1 \cdot 10^4$ Zellen in 100 μ l RFG-Medium mit unterschiedlichen Zytokin-Konzentrationen in Dreifachbestimmung eingesetzt. Diese Platte inkubiert für 42h unter Standardbedingungen. Die Analyse der induzierten Proliferation wird unter Verwendung des Kits 'Cell Titer Glo' (Promega) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.3.9 Zell-ELISA

Mit Hilfe des Zell-ELISAs ist es möglich, Antigen-Antikörper-Reaktionen nachzuweisen. Dazu werden allerdings intakte Zellen verwendet, sodass durch geeignete Antikörper bestimmte, auf der Oberfläche der Zellen exprimierte Proteine und Strukturen erkannt werden können. Damit ist es möglich, die Expression von Proteinen, speziell Rezeptoren auf der Zelloberfläche nachzuweisen.

Pro Ansatz setzt man ca. $2 \cdot 10^5$ Zellen ein, wäscht diese mehrfach mit ELISA-Puffer (1x PBS mit 3 % BSA) und gibt anschließend den Primär-Antikörper (1 μ g / 200 μ l Zellsuspension) dazu. Nach 60 minütiger Inkubation werden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen, anschließend gibt man den Sekundär-Antikörper (goat anti-mouse) 1:10.000 verdünnt hinzu und inkubiert die Ansätze für weitere 60 min. Nach erneutem Waschen in ELISA-Puffer werden die Zellen in 100 μ l Puffer aufgenommen, davon werden 80 μ l zur Messung in eine weiße 96-Well-Platte überführt. Im Verhältnis 1:1 gibt man nun ECL-Lösung in die Wells. Dieses setzt als Substrat das an die gebundenen Sekundär-Antikörper gekoppelte HRP-Konjugat um. Ausgesendet wird dadurch ein Lumineszenzsignal, welches im Luminometer Glomax (Promega) detektiert wird.

2.3.10 Zytometrische Oberflächen-Analyse (FACS - *Fluorescence-activated cell sorting*)

Unter Verwendung von spezifischen Antikörpern können oberflächenpräsentierte Protein (z.B. Rezeptoren) auf Zellen sichtbar gemacht werden. Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen durch eine Kapillare in das Durchflusszytometer gesaugt, sodass diese hintereinander durch eine Fließkammer strömen und einzeln an einem Laserstrahl vorbeigleiten. Das auftreffende Licht wird dabei in unterschiedliche Richtungen abgelenkt. Vorwärts gestreutes Licht („Forward Scatter“, FSC) gibt Auskunft über die relative Größe der Zelle, seitwärts gestreutes Licht („SmE Scatter“, SSC) ist ein Maß für die Oberflächenbeschaffenheit/Granularität der Zelle. Verschiedene Fluoreszenzkanäle können die Bindung von Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern an die Zellen erfassen. Für diesen Nachweis werden ca. $1 \cdot 10^5$ Zellen abzentrifugiert, mit

PBS gewaschen und für ca. 30 min mit 50 µl Antikörperlösung (1 µg Antikörper) inkubiert. Zum Nachweis der Expression von Rezeptorketten wird vorwiegend der α P5D4-Tag-Antikörper als primärer Antikörper verwendet, welcher den n-terminalen P5D4-Tag bindet. Dieser Tag ist in den Konstrukten, welche zur Rezeptorexpression verwendet werden, standardmäßig nach dem IL-4R α -Signalpeptid einkloniert. Der Nachweis der Bindung des Antikörpers erfolgt mit einem Fluoreszenz-gekoppelten (meist FITC- oder PE-gekoppelt) sekundären goat-anti-mouse-Antikörper, eingesetzt 1:100 in 50 µl PBS. Zur Analyse im Zytometer (CyFlow Space, Partec) werden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen. Die Detektion der Proteinexpression erfolgt anschließend im Zytometer nach Standardprotokoll im Fluoreszenzkanal 1 (FL-1) für FITC, im Fluoreszenzkanal 2 (FL-2) für PE-Kopplung. Untransfizierte Zellen werden jeweils gleich behandelt und als Negativkontrolle verwendet. Zur Auswertung werden die Daten im Dotplot (aufgetragen FL-1 gegen FL-2) aufgetragen und so in einem Quadranten-Gate eingefasst, dass sich 100 % der Zellen im linken, unteren Quadranten befinden. Eine Rezeptorexpression wird sichtbar durch die Verschiebung der Signale auf der entsprechenden Fluoreszenzsignal-Achse nach rechts (höhere Fluoreszenzaktivität), die Zellen außerhalb des linken, unteren Quadranten werden exprimierend angesehen und prozentual bestimmt.

2.3.11 Bakteriendisplay

Induktion und Proteinexpression

Bakterien des Stammes BMH71/18 werden mit den Expressionsplasmiden pASKIEP-hTSLP-P5D4 oder pASKIEP-hTSLPW148A-P5D4 nach Standardprotokoll transformiert, auf Chloramphenicol-Agarplatten ausplattiert und über Nacht im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wird jeweils eine Kolonie gepickt und über Nacht in einer 5 ml-Kultur in LB-Medium + Chloramphenicol (eingesetzt 1:1000 vom Stock (34 mg/ml)) expandiert. Folgend wird eine Hauptkultur angeimpft (1:100 aus der Vorkultur) und in ca. 2-3 h bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0.2 bei 37 °C und 190 rpm geschüttelt. Anschließend wird die Bakterienkultur in 2 Kulturen gesplittet, jeweils uninduziert oder mit 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin (AHT) zur Proteinexpression induziert, für 1 h weiterkultiviert. Der TET-Promotor, welcher die Expression des Intimin-TSLP-Fusionsproteins kontrolliert, ist durch die Zugabe von Anhydrotetracyclin (AHT) induzierbar. Der TET-Repressor ist ebenfalls auf dem pASKIEP-Plasmid kodiert und wird konstitutiv exprimiert. Die Expression des klonierten Gens wird bis zur Induktion durch AHT strikt unterdrückt. Nach der Kultivierung werden die Bakterien zunächst für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit PBS eine Bakteriensuspension mit der optischen Dichte OD₆₀₀ von 1.0 titriert. Anschließend wird der Probe zur Inhibition des Bakterienwachstums Gentamycin zur finalen Konzentration von 0,5 µg/ml zugegeben, über Nacht bei 4 °C inkubiert und für weitere Fragestellungen verwendet.

Nachweis Proteinexpression

Der Nachweis der Proteinexpression auf der Oberfläche der Bakterien kann sowohl zytometrisch als auch chemoluminometrisch erfolgen. Dabei kann die chemoluminometrische Methode

allerdings nur die Aussage treffen, ob die Bakterien erfolgreich induziert wurden, allerdings ist es nicht möglich, die genaue Anzahl der induzierten Bakterien zu bestimmen. In beiden Fällen wird die Expression des P5D4-Tags, welche zusammen mit der Expression des Zielproteins und des membranständigen Proteins Intimin erfolgt, für den Nachweis genutzt. Für den Chemolumineszenz-Assay werden 200 µl Bakteriensuspension mit 0,5 µg αP5D4-AK als primärem Antikörper versetzt und für 30 min inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wird die Probe mit sekundärem Antikörper für weitere 30 min inkubiert. Hierzu wird HPR-gekoppelter goat-anti-mouse Antikörper (eingesetzt 1:100 in PBS verdünnt) verwendet. Anschließend werden die Zellen nach zweimaligem Waschen in 50 µl PBS aufgenommen, jeweils mit 50 µl ECL-Lösung gemischt und im Luminometer GLOMAX luminometrisch gemessen. Uninduzierte Bakterien werden jeweils gleich behandelt und als Negativkontrolle verwendet. Für die cytometrische Methode wird 1 ml Bakteriensuspension zunächst zentrifugiert (1 min / 10.000 rpm) und das Pellet anschließend mit 10 µl P5D4-Antikörperlösung (0,2 µg/µl) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1 ml kaltem PBS und erneute Zentrifugation als Waschschritt. Im nächsten Schritt wird das Bakterienpellet in 10 µl anti-mouse-IgG-Biotin (1: 10 verdünnt in PBS) aufgenommen und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt werden die Bakterien zur Detektion mit 10 µl Streptavidin-FITC (1:10 verdünnt in PBS) versetzt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Detektion der Proteinexpression erfolgt anschließend im Zytometer nach Standardprotokoll im Fluoreszenzkanal 1 (FL-1). Uninduzierte Bakterien werden jeweils gleich behandelt und als Negativkontrolle verwendet. Zur Auswertung werden die Daten der uninduzierten Bakterien im Dotplot (aufgetragen FL-1 gegen FL-2) aufgetragen und so in einem Quadranten-Gate eingefasst, dass sich 100 % der Bakterien im linken, unteren Quadranten befinden. Eine Induktion der Bakterien wird sichtbar durch die Verschiebung der Signale auf der FL-1-Achse nach rechts (höhere Fluoreszenzaktivität), die Bakterien außerhalb des linken, unteren Quadranten werden als induziert und damit TSLP-exprimierend angesehen und prozentual bestimmt. Zur weiteren Verwendung im Aktivitätsassay werden nur Proben mit vergleichbarer Expression verwendet.

Nachweis Proteinaktivität mittels Luciferaseassay

Zur Bestimmung der biologischen Aktivität des exprimierten Proteins (hier TSLP) werden TSLP-responsive BaF3-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der induzierten Bakterien stimuliert. Nach Standardprotokoll eines Reportergen-Assays werden BaF3-TSLPR-Zellen zunächst für 6 h zytokinstarviert, mit dem STAT1-responsiven Reportergenkonstrukt pGL3-IRF1-luc mittels Elektroporation (Nucleofector, siehe Protokoll Reportergen-Assay, Kapitel 2.3.7) transient transfiziert und in eine 96-Well-Platte zu je $1 \cdot 10^5$ Zellen/Well in 100 µl RFG-Medium eingesät. Die Bakterien werden in unterschiedlicher Anzahl in 100 µl RFG-Medium aufgenommen und ebenfalls zu der Zellsuspension gegeben. Humanes TSLP (20 ng/ml) und uninduzierte Bakterien in vergleichbarer Anzahl werden als Kontrolle eingesetzt. Die BaF3-Zellen werden nun für 6 h im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Hierbei bindet das exprimierte Zytokin auf den induzierten Bakterien den entsprechenden Rezeptor auf

den BaF3-TSLPR-Zellen, welcher damit aktiviert wird und die Transkription des Reportergens Luciferase induziert. Anschließend erfolgt die Bestimmung der transkriptionalen Aktivität von STAT1 luminometrisch nach dem Protokoll des Mono-Luciferase-Assays.

2.3.12 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) aus Vollblut

Für Arbeiten mit Zellmaterial aus humanem Vollblut lag eine Zustimmung der lokalen Ethikkommission vor. Die Isolierung der PBMC erfolgt aus Vollblutkonserven (Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Jena). Die Auswahl der Spender erfolgte zufällig und ohne Berücksichtigung von Geschlecht oder Blutgruppe. Das Blut wird zunächst 1:1 mit PBS gemischt und in Falcons im Verhältnis 4:1 über das Dichtegradientenmedium (Ficoll) geschichtet. Es folgt die Zentrifugation über 15 min bei 1000 x g. Anschließend werden Monozyten und Lymphozyten (erkennbar als weißer Ring in der Interphase) vorsichtig mit der Pipette aufgenommen, mehrfach mit PBS gewaschen und für die weitere Verwendung vorbereitet.

2.3.13 Isolierung von Monozyten aus PBMCs, Generierung von dendritischen Zellen

Wie zuvor beschrieben, werden PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) aus Vollblut isoliert. Zur Anreicherung der Monozyten stehen zwei Varianten zur Verfügung. Bei der ersten Variante wird das MACS-System (*Magnetic-activated Cell Sorting*) der Firma Milteny Biotech nach Herstellerprotokoll verwendet. Zunächst erfolgt die Inkubation der Zellen mit magnetisierten Beads, welche über gekoppelte monozyten-spezifische CD14-Antikörper Monozyten binden. Durch das Feld eines Magneten werden diese Zellen zurückgehalten und ungebundene Zellen durch mehrmaliges Waschen entfernt. Anschließend können die angereicherten Monozyten eluiert und in Kultur genommen werden. In der zweiten Variante wird die schnelle Adhäsionsfähigkeit der Monozyten an Böden der Zellkulturflaschen genutzt, um diesen von nicht-adhätierenden Zellen zu trennen. Dazu werden PBMCs in 6-Well-Platten zu $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingesät und für 45 min im Brutschrank inkubiert. Nicht-adhätierende Zellen werden vorsichtig mit warmem Medium abgespült und die Zellen anschließend für weitere Versuche verwendet. Zur Generierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen werden die zuvor angereicherten Zellen mit 40 ng/ml IL-4 und 40 ng/ml GM-CSF für 7 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Differenzierung zu DCs kann im FACS unter Verwendung spezifischer Oberflächenmarker täglich überprüft werden. Dabei wird sich das Signal für CD14 als Marker für Monozyten reduzieren, das Signal für CD11c als Marker für DCs ansteigen.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Zelllyse

Die Zelllyse dient der Extraktion der Zellproteine. Für die Lyse findet der NP-40 Lysepuffer Anwendung. Um den Abbau der Proteine durch Proteasen zu verhindern und nicht den aktuellen Phosphorylierungsstatus durch Dephosphorylierung zu verändern, werden dem

Lysepuffer Phosphatase- und Proteaseinhibitoren zugefügt. Die Zellpellets werden mit 10-15 µl (je nach Größe des Pellets) des Lysepuffers versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Um im Kern enthaltene Proteine zu erhalten, werden die Zellkerne durch abwechselndes Bad in flüssigem Stickstoff und 37 °C warmem Wasserbad zerstört. Anschließend werden die Zellfragmente bei 14.000 rpm und 8 °C für 15 min abzentrifugiert, der Überstand wird für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford und SDS-PAGE weiterverwendet.

2.4.2 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Die Proteinbestimmung wird nach der Methode von Bradford ([18]) durchgeführt. Zunächst nimmt man eine Eichkurve mit verschiedenen Verdünnungen einer Rinderserumalbumin (BSA)-Stammlösung auf. Dazu wird 1 ml Bradford-Reagenz (Roti®-Quant, Roth GmbH) 1:5 in Aqua dest. verdünnt und 2 ml davon in einer Einwegküvette vorgelegt. Jeweils 2 µl der zu untersuchenden Probe bzw. der jeweiligen Verdünnung des Standards werden hinzu pipettiert, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 595 nm an dem Gerät Nano-Drop (PeqLab). Mit Hilfe der erhaltenen Extinktionswerte der einzelnen Standardkonzentrationen kann so eine Regressionsgerade ermittelt werden, anhand derer der Proteingehalt der einzelnen Proben bestimmt wird.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE, bei der Natriumdodecylsulfat (SDS) als Detergenz eingesetzt wird, um die Proteine zu denaturieren und negativ zu laden, erfolgt nach der Standardmethode nach Lämmli et al.. Zur phosphospezifischen Untersuchung von Signalmolekülen werden 8,4 %ige Polyacrylamid – Gele verwendet, zur Auftrennung von sehr kleinen Proteinen wird die Konzentration von Acrylamid auf bis zu 17,5% erhöht. Die polymerisierten Gele werden in die Apparaturen von BioRad eingespannt, die Kammern mit Elektrophoresepuffer (10x: 2 M Glycin, 0,25 M Tris, 35 mM SDS), gefüllt und die Geltaschen mit einer Proteinmenge von 20 µg beladen. Zuvor versetzt man die Probe mit SDS – Probenpuffer (33,3 % (v/v) SDS-Lösung (20 % SDS); 10 % (v/v) Tris-Lösung (1 M pH6,8); 33,3 % (v/v) Glycerol; 33,3 % (v/v) Mercaptoethanol; Spatelspitze Bromphenolblau) und denaturiert die Proteine bei 95 °C für 10 min. Die Auftrennung der Proteine erfolgt für 20 min bei 100 V, 250 mA (Sammelgel) und für 60-90 min bei 180 V, 500 mA (Trenngel).

Sammelgelpuffer: TRIS - HCl 0,5 M, pH 6,8

Trenngelpuffer: TRIS - HCl 2 M, pH 8,0

Anschließend können die Proteine für Antikörper-Nachweise durch Western Blotting auf Nitrocellulose-Membranen übertragen oder durch Comassie- oder Silberfärbung sichtbar gemacht werden.

2.4.4 Western Blotting

Die zu detektierenden Proteine werden in vorangegangenen Schritt im Gel der Größe nach aufgetrennt und müssen nun auf eine Nitrocellulose-Membran überführt werden, um sie mit einem spezifischen Antikörper zu detektieren. Zum Transfer nutzt man eine Blot-Apparatur von Biorad, die mit 1x Transferpuffer (10,5 mM Tris; 202,6 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; pH 7,5) gefüllt wird. Der Blotvorgang dauert bei 100 V und 300 mA je nach Größe der Zielproteine 90-120 min. Nach dem Blotten wird die Membran 15 min in 1x Ponceau-Rot (10x: 2,6 mM Ponceau S; 0,185 M Trichloressigsäure (TCA); 0,118 M Sulfosalicylsäure) geschwenkt. Durch die auftretende Färbung kann optisch kontrolliert werden, ob der Transfer erfolgreich war und überall die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde.

2.4.5 Immunodetektion

Nach dem Blotten wird die Membran mit Blockpuffer (1 x TBS, 0,1 % Tween 20, 5 % Magermilchpulver) für 60 min blockiert und danach 2 x 5 min mit TBS-T (10x: 1,54 M NaCl; 1,3 M Tris; pH 7,5; 0,1 % Tween 20 zu 1x TSB-T) gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation der Membran mit in 1x TBS-T verdünntem primärem Antikörper über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken. Nachdem die Antikörperlösung entfernt wurde, erfolgt durch fünfmaliges Waschen der Membran mit 1x TBS-T für je 10 min die Entfernung von nicht gebundenem primärem Antikörper. Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Durch mehrmaliges Waschen (5x mit 1x TBS-T je 10 min) sollte auch hier nicht gebundener sekundärer Antikörper von der Membran entfernt werden. Zur Detektion wird die Membran mit 1 ml ECL-Lösung und im Detektionsgerät von VWR je nach Signalstärke 1 bis 15 min Nach der Entwicklung kann die Membran bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren oder gestrippt werden.

2.4.6 Entfernung gebundener Antikörper von der Blotmembran (Strippen der Membran mit β -Mercaptoethanol)

Die Membran wird mit 50 ml Strippuffer (32,8 mM Tris; 35 mM SDS; 0,78 % (v/v) Mercaptoethanol; pH 6,7) in einem 50 ml-Röhrchen 40 min bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Damit lassen sich alle primären und sekundären Antikörper von der Membran lösen. Nach einstündiger Blockierung der Membran mit Blockpuffer und mehrmaligem Waschen in 1x TBS-T kann die Membran für einen weiteren immunochemischen Nachweis verwendet werden.

2.4.7 Immunpräzipitation

Für diesen Versuch werden ca. 20 Mio. Zellen pro Ansatz benötigt. Zum Vergleich der Phosphorylierungen werden die Zellen zunächst in zytokinfreiem Medium für 6 h starviert, anschließend wird ein Ansatz mit dem Wachstumsfaktor stimuliert. Wie (unter 2.4.1) beschrieben, werden die Zellen mit NP40-Lysepuffer lysiert. Nach der Lyse verbleiben die Zellen zunächst für 30 min auf Eis und werden anschließend bei 14.000 rpm für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und mit dem gewünschten Antikörper versetzt. Während

die Probe für 30 min über Kopf schüttelt, bindet sich der Antikörper an die im Überstand zu detektierenden Proteine. Die Beads werden so vorbereitet, dass bei allen Ansätzen ungefähr die gleiche Menge eingesetzt wird. Sie werden mehrfach mit NP40-Lysepuffer gewaschen und für jeweils 3 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Man gibt nun den Überstand mit dem Antikörpern hinzu und inkubiert diesen Ansatz schüttelnd über Nacht bei 4 °C. Die Auftrennung der Proteine und die Detektion erfolgen nun mittels SDS-PAGE und Western Blot nach Standardprotokollen. Die über Nacht inkubierten Proben werden mehrfach auf Eis mit Lysepuffer gewaschen und wieder abzentrifugiert, anschließend mit Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Dabei lösen sich die Antikörper von den Beads. Diese werden bei 14.000 rpm für 20 sec abzentrifugiert, die Überstände werden auf ein 8,4 %iges Gel aufgetragen, aufgetrennt und mittels Western Blot detektiert.

2.4.8 Silberfärbung

Zur Färbung von Proteinen, welche zuvor elektrophoretisch getrennt wurden, wird die Silberfärbung angewendet. Sie ist sensitiver als die Comassie-Färbung und wird nach Standardprotokoll durchgeführt ([115])

Natriumthiosulfat-Lösung: 0;02 % [w/v] $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$

Silbernitratlösung: 100 mg AgNO_3 , 37 μl 37 % Formaldehyd, 50 ml Wasser

Fixierlösung: 100 ml Methanol, 24 ml Essigsäure, 76 ml Wasser,
100 μl 37 % Formaldehyd

Entwicklerlösung: 12 g Na_2CO_3 , 80 μl 0;1 % [w/v] $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$,
100 μl 37 % Formaldehyd, 200 ml Wasser

2.4.9 ELISA

Mit der Methode des ELISA (*Enzym-linked Immunosorbent Assay*) kann die Bindung von Proteinen aneinander oder die Bindung von Antikörpern an ein spezifisches Protein nachgewiesen werden. Dazu wird das zu untersuchende Protein mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS über Nacht an ELISA-Platten im 96-Well-Maßstab gebunden. Am nächsten Tag wird die Platte zunächst mit Elisapuffer (PBS + 2 % (v/v) BSA) für 2 h inkubiert und somit nicht besetzte Bindungsstellen geblockt. Es folgt die Inkubation mit dem primären Antikörper (eingesetzt 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Elisapuffer) für 1 h. Der Nachweis der Bindung erfolgt mit einem sekundären HRP-gekoppelten goat-anti-mouse-Antikörper (eingesetzt 1:3000 in PBS+BSA). Nach einstündiger Inkubation wird TMB-Substrat (10 mM Natrium-Citratpuffer + 0,2 % (v/v) TMB-Lösung (10 mg/ml Stock) + 0,2 % (v/v) H_2O_2 (1 %ig), pH 3.0) dazugegeben, welches sich nach Aktivierung durch Peroxidase blau färbt. Diese Reaktion wird mit 1 M Schwefelsäure abgestoppt, wodurch ein Farbumschlag ins Gelb erfolgt. Die Auswertung erfolgt im Photometer (Sunrise, Tecan) bei 492 nm Wellenlänge. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten werden die Wells dreimal mit jeweils 100 μl Waschpuffer (PBS + 0,05% (v/v) Tween 20) gewaschen. Für

alle ELISA wurden Half-Area-Platten verwendet, das Volumen aller Lösungen betrug 40 µl/Well (80 µl/Well in den Waschschritten).

2.4.10 Rekombinante Herstellung des TSLP

Protein-Expression

Das Expressionsplasmid für TSLP wird in den *E.coli*-Stamm BL21 (DE3) transformiert. Auf der Agar-Platte gewachsene Klone werden einzeln gepickt und in 5 ml-Vorkulturröhrchen zur Testinduktion expandiert. Diese erfolgt mit 1 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,5. Ein Teil uninduzierte Kultur wird für die spätere Hauptkultur zurückgehalten. Die Kontrolle auf Expression des Proteins erfolgt nach SDS-PAGE und Comassie-Färbung im Vergleich zur uninduzierten Probe. Dazu werden je nach OD 50-200 µl Vorkultur abzentrifugiert und in 10 µl Proteinprobenpuffer aufgenommen. Ein exprimierender Klon wird anschließend im 2 L-Erlenmeyerkolben in 800 ml LB-Medium als Hauptkultur expandiert, ebenfalls bei OD₆₀₀ von 0,5 induziert und für weitere 2-3 h inkubiert. Die Bakterien werden bei 4000 rpm für 20 min abzentrifugiert und anschließend 3 mal im Hochdruckhomogenisator bei bis zu 1000 bar aufgeschlossen. Nachfolgendes Zentrifugieren bei 4000 rpm für 20 min sedimentiert die reinen *Inclusion Bodies* (IB). Im Überstand befinden sich die Zelltrümmer, die durch vorsichtiges Überspülen entfernt werden können.

Proteinaufreinigung

50 mg der Inclusion Bodies werden in 500 µl 20 mM Natriumphosphat aufgeschlämmt und mit 1,5 ml Denaturierungspuffer für 2 h geschüttelt. Anschließend wird die Probe mit 2 ml 20 mM Natriumphosphat und 6 ml Denaturierungspuffer auf 10 ml verdünnt, gegen 500 ml Rückfalte-Puffer für 24 h im Kühlschrank dialysiert und damit langsam rückgefaltet. Es folgt die Dialyse im Dialysepuffer für 24 h im Kühlschrank. Die Aufreinigung des rückgefalteten Proteins erfolgte unter Verwendung von Ionen-Austausch-Chromatographie. Der isoelektrische Punkt (pI) des Proteins liegt bei pH 9.63. Für die meisten bakteriellen Proteine wird aus Erfahrung angenommen, dass sie bei einem pH-Wert von 8.0 eine negative Summenladung haben, sie binden im ersten Schritt der Aufreinigung (pH 8.0) an die Matrix des Anionen-Austauschers (Q-Sepharose). Das positiv geladene Zielprotein bindet nicht und ist im Durchlauf zu finden. Im Folgenden wird der pH-Wert auf 7.0 reduziert, der Durchlauf über einen Kationen-Austauscher (CM-Sepharose) gegeben. Das weiterhin positiv geladene Zielprotein bindet nun an die Matrix, neutral geladene bakterielle Proteine befinden sich im Durchlauf. Bei der anschließenden Elution wird das Zielprotein gleichzeitig aufkonzentriert. Es erfolgt Dialyse, Sterilfiltration und Konzentrationsbestimmung des Proteins.

Denaturierungspuffer 8 M GnHCl + 0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol, pH 8.0

Dialysepuffer 20 mM Natriumphosphat + 10 mM Tris + 1 mM EDTA

Rückfaltepuffer 20 mM Natriumphosphat + 10 mM Tris pH 8,0 Glutathion
reduzierend 0,2 mM + Glutathion oxidierend + 500 mM Arginin, pH 8.0

Equilibrierungspuffer 20 mM Natriumphosphat und 10 mM Tris, pH nach Anwendung
Elutionspuffer 20 mM Natriumphosphat + 1 M NaCl, pH 8.0

3 Ergebnisse

3.1 Die Signaltransduktion des humanen TSLP-Rezeptors

Das Zytokin TSLP und sein Rezeptor spielen eine wichtige Rolle in allergisch-entzündlichen Prozessen. TSLP wird vorwiegend von epithelialen Zellen der Haut und der Lunge nach Allergen-Kontakt exprimiert und stimuliert nachfolgend Zellen des Immunsystems um eine TH₂-Immunantwort auszulösen. Die Signaltransduktion des humanen TSLP-Rezeptors, welcher vorwiegend auf dendritischen Zellen, Mastzellen und CD4⁺-T-Zellen exprimiert wird, ist allerdings nur sehr unzureichend verstanden. Um mögliche Ansatzpunkte zur Regulierung des TSLP-Rezeptors zu finden, muss zunächst dessen intrazelluläre Signalkaskade aufgeklärt werden. Ein genaueres Wissen darüber wird ebenfalls benötigt, wenn funktionale, inhibitorische Moleküle und deren Einfluss auf die Aktivität des Rezeptors charakterisiert werden sollen.

3.1.1 Untersuchungen zur intrazellulären Signalweiterleitung des humanen TSLP-Rezeptors

Für die Untersuchung der intrazellulären Signalweiterleitung des TSLP-Rezeptors wurde die Zelllinie BaF3-TSLPR als Modellsystem verwendet. Grundlage hierfür ist die faktorabhängige murine pro-B-Zelllinie BaF3. Sie ist von dem murinen haematopoetischen Wachstumsfaktor mIL-3 abhängig und wurde aus fötalen Leberzellen von BALB/c-Mäusen abgeleitet ([107]). Die transiente Transfektion der humanen TSLPR α - und der humanen IL-7R α -Kette über den Vektor pcDNA-3.1 in die Zelllinie BaF3 und der anschließende zytokininduzierte Selektionsdruck führte zum stabilen Einbau der Rezeptor-DNA in die Wirts-DNA und zu einer dauerhaften Expression der Rezeptorketten auf der Zelloberfläche (Diplomarbeit Katrin Sebastian, 2008 [126]). Die Expression der Rezeptorketten auf der Zelloberfläche wurde zytometrisch unter Verwendung des n-terminalen P5D4-Tags und Rezeptorketten-spezifischer Antikörper regelmäßig bestätigt (Daten nicht gezeigt). Durch die stabile Rezeptorexpression konnte das native Proliferationssignal von mIL-3 durch das von hTSLP ersetzt werden, wodurch die Zellen nun in Abhängigkeit von der Zugabe von hTSLP im Kulturmedium proliferierten. Diese Abhängigkeit lässt sich in einem Proliferationsassay nachweisen, hierbei werden BaF3-TSLPR-Zellen unter Zugabe von verschiedenen Konzentrationen hTSLP für 48 h kultiviert (siehe Abbildung 3). Damit kann gezeigt werden, dass das Wachstum der BaF3-TSLPR-Zellen direkt mit der eingesetzten Menge an hTSLP im Kulturmedium korreliert. Diese Faktorabhängigkeit wird regelmäßig überprüft, ebenso wie die Eigenschaft der Zellen, ohne Zugabe von TSLP nicht proliferieren zu können, um eine Faktorunabhängigkeit der Zelllinie auszuschließen.

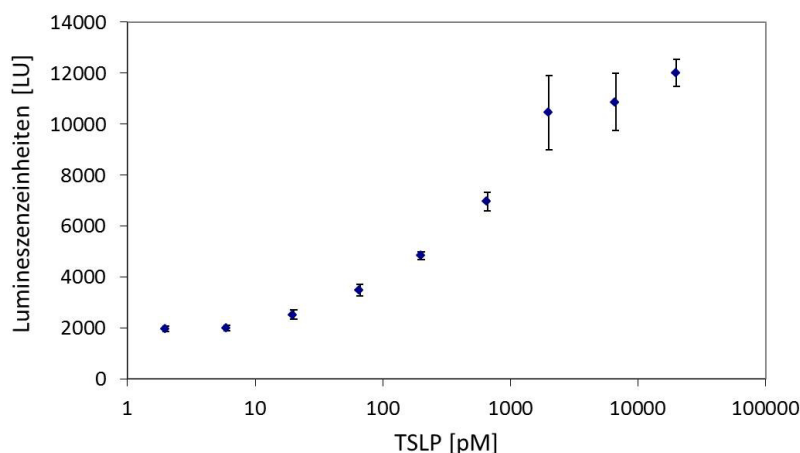


Abbildung 3: TSLP-induzierte dosisabhängige Proliferation von BaF3-Zellen durch stabile Transfektion der TSLP-Rezeptorketten BaF3-TSLPR-Zellen wurden zunächst für 6 h starviert, anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen hTSLP stimuliert und für 48 h kultiviert. Die oxidative Umwandlung von MTS-Tetrazolium-Reagenz in Formazan und die dabei entstehenden Absorptionsänderung korreliert dabei mit der Anzahl an vitalen Zellen und wird als Maß für die Proliferation angesehen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Versuchen, die Standardabweichungen resultieren aus der Abweichung innerhalb einer Dreifachbestimmung.

Diese TSLP-responsive Zelllinie wurde nun für Experimente eingesetzt, die neue Erkenntnisse über beteiligte Signalmediatoren liefern sollten. Bekannt ist bereits, dass eine Stimulation des TSLP-Rezeptors mit hTSLP in BaF3-Zellen die Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT5 phosphorylieren und somit aktivieren kann ([117]). Weitere Hinweise zur transkriptionalen Aktivität der STATs und vorgeschalteter Signalmoleküle sind allerdings nicht bekannt. Zur Untersuchung des Phosphorylierungsstatus weiterer Signalmediatoren wurden die Zellen zunächst für 6 h zytokinfrei kultiviert (ausgehungert, starviert) und anschließend mit 1,3 nM hTSLP für 15 und 30 Minuten stimuliert. Im Western Blot konnte mit phosphospezifischen Antikörpern zusätzlich zu STAT3 und STAT5 noch die TSLP-abhängige Phosphorylierung von STAT1 sowie der Janus-Kinasen JAK1 und JAK2 gezeigt werden. Die transkriptionale Aktivität der identifizierten STATs wurde mittels Reportergen-Assay unter Verwendung von STAT-spezifischen Reportergen-Konstrukten untersucht. Die Ergebnisse des Versuchs legen nahe, dass die Transkriptionsfaktoren nach ihrer Phosphorylierung in den Zellkern wandern und dort genregulatorisch wirksam sind (siehe Abbildung 4).

Um eine direkte Interaktion der phosphorylierten Janus-Kinasen und STATs nachzuweisen, wurde ein spezifischer Inhibitor der Mitglieder der Janus-Kinase-Familie (Jak Inhibitor I InSolution (P6)) eingesetzt. Dieser besetzt die Kinasedomäne der JAKs, verhindert so die Phosphorylierung und damit die Aktivierung nachgeschalteter Signalmoleküle ([140]). In Abbildung 5 wird der Einfluss des JAK-Inhibitors P6 auf die TSLP-induzierte Signalweiterleitung dargestellt.

Im Western Blot konnte dabei für TSLP-stimulierte BaF3-TSLPR-Zellen mit steigender Inhibitor-Konzentration eine verringerte Phosphorylierung für JAK1/2 und STAT1/3/5 gezeigt werden. Durch Einsatz des Inhibitors P6 im Reportergen-Assay wurde außerdem die

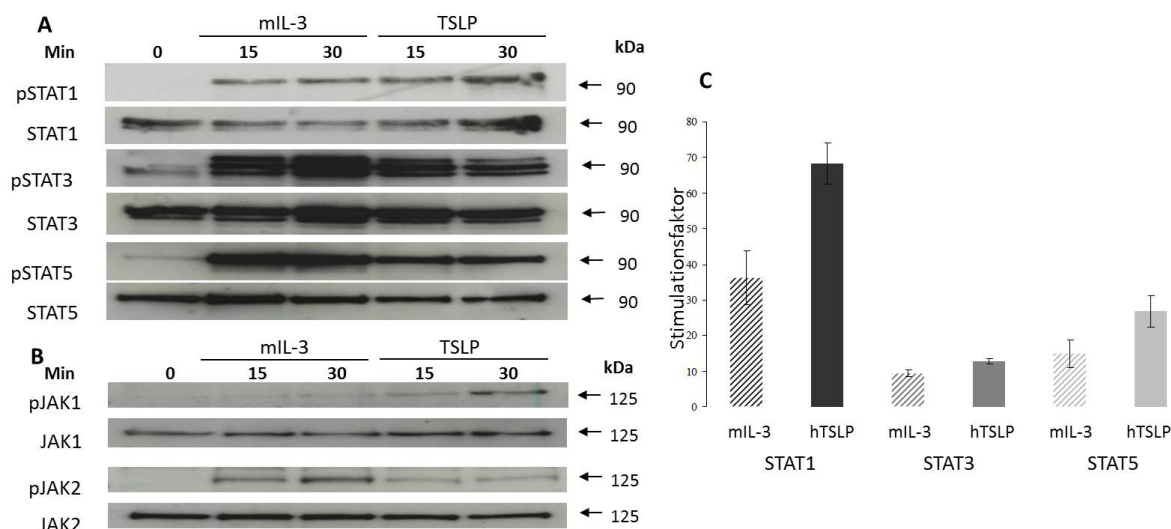


Abbildung 4: Analyse der durch den TSLP-Rezeptor induzierten JAK/STAT-Aktivierung in der Zelllinie BaF3-TSLPR (A) zeigt die Western Blot-Analyse der mIL-3- und hTSLP-induzierten Phosphorylierung von STATs in BaF3-TSLPR-Zellen. Hierzu wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen zunächst in zytokin-freiem Medium starviert, anschließend mit unterschiedlicher Dauer mit mIL-3 (1,3 nM) und hTSLP (1,3 nM) stimuliert. Der Phosphorylierungsstatus wurde mit Antikörpern gegen Tyrosin-phosphorylierte STATs im Western Blot sichtbar gemacht. Um den gleichmäßigen Probenauftrag nachzuweisen, wurden die Blots gestrippt und mit Antikörpern gegen STAT1, STAT3 und STAT5 nachgefärbt. In vergleichbarer Weise wurde der mIL-3- und hTSLP-abhängige Phosphorylierungsstatus der Janus-Kinasen JAK1 und JAK2 analysiert (B). (C) zeigt den Einfluss von hTSLP auf die transkriptionale Aktivität der STATs durch Verwendung von STAT-spezifischen Reporter-Gen-Konstrukten. $5 \cdot 10^6$ BaF3-TSLPR-Zellen wurden zunächst für 6 h starviert und nachfolgend mit jeweils 5 µg Reporter-Gen-Plasmid (STAT1: pGL3-CIS-luc / STAT3: pGL3-SOCS3-luc / STAT5: pGL3-CIS-luc) durch Elektroporation transfiziert. Die Zellen wurden anschließend mit 1,3 nM hTSLP und 1,3 nM mIL-3 als Positivkontrolle stimuliert. Nach 12 h wurden die Zellen lysiert und die gebildete Luciferase mittels Luciferase-Assay luminometrisch bestimmt. Dargestellt ist das Verhältnis der Lumineszenz der stimulierten (mIL-3 o. hTSLP) zur unstimulierten Probe. Es werden die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen gezeigt. (Abbildung aus [152])

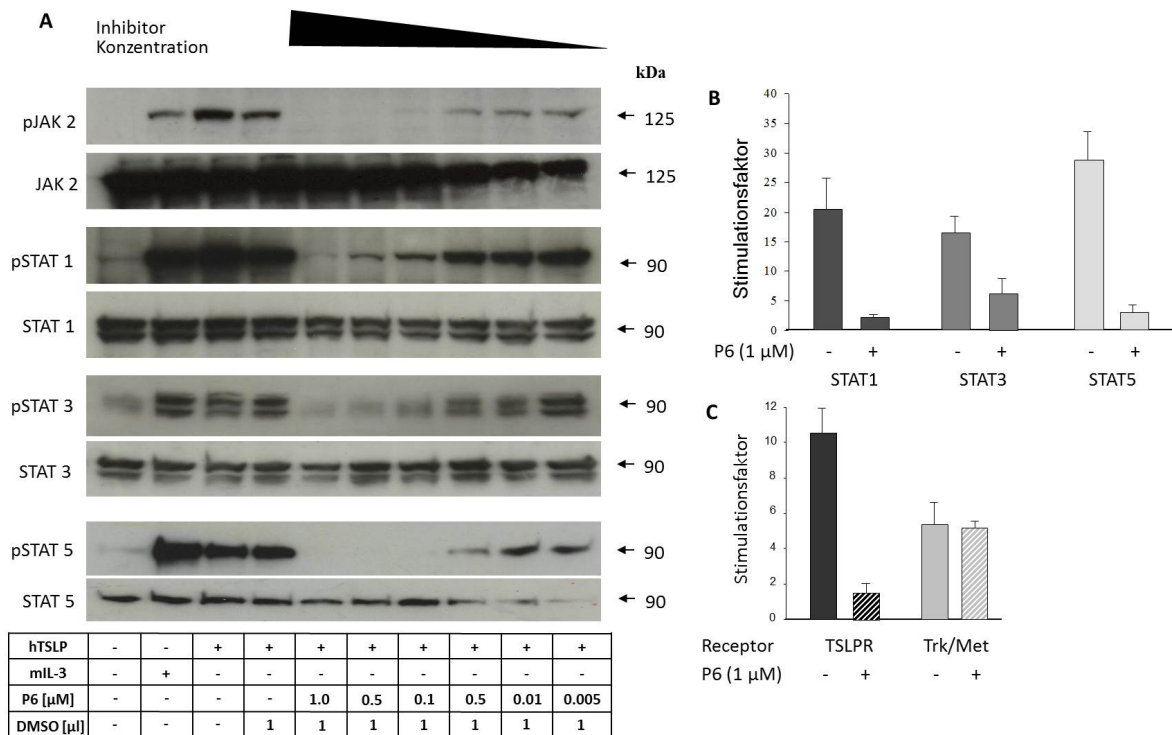


Abbildung 5: Betrachtung des Zusammenwirkens der TSLP-vermittelten Aktivierung der Janus-Kinasen und STATs (A) zeigt die Wirkung der JAK-Inhibitoren P6 auf die Tyrosin-Phosphorylierung von STATs. Hierzu wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen zunächst in zytokinfreiem Medium starviert, anschließend mit unterschiedlicher Dauer mit mIL-3 (1,3 nM) und hTSLP (1,3 nM) stimuliert. In der Starvierungs- und Stimulationszeit enthielt das Kulturmedium unterschiedliche Konzentrationen des JAK-Inhibitors P6, gelöst in DMSO. Der Phosphorylierungsstatus wurde mit Antikörpern gegen Tyrosin-phosphorylierte STATs und JAK2 sichtbar gemacht. Der gleichmäßige Probenauftrag wurde mit Antikörpern gegen STAT1, STAT3, STAT5 und JAK2 nachgewiesen. In (B) wird der Einfluss des JAK-Inhibitors auf die TSLP-induzierte STAT-Aktivierung dargestellt. Die Starvierung der BaF3-Zellen erfolgte wie in (A), ohne oder mit Zugabe von P6 (1 μ M). Unter Verwendung von STAT-spezifischen Reporterkonstrukten konnte im Luciferase-Assay die TSLP-induzierte Lumineszenz gemessen werden. Gezeigt wird der Stimulationsfaktor, gebildet aus der Lumineszenz der TSLP-stimulierten (1,3 nM) im Verhältnis zur unstimulierten Probe. Es werden die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen gezeigt. Um den Einfluss des Inhibitors P6 auf die STAT-Aktivierung auszuschließen, wurde in (C) die transkriptionale Aktivität von STAT3 durch den TSLPR und die Rezeptor-Tyrosinkinase TRK/Met verglichen. BaF3-Zellen wurden entweder unbehandelt oder unter Zusatz von 1 μ M JAK-Inhibitor P6 starviert. Nach der Transfektion der Zellen mit entweder den Ketten des TSLPR oder dem Trk/Met-Rezeptors zusammen mit einem STAT3-responsiven Reporterkonstrukt pGL3-SOCS3-luc erfolgte die Stimulation mit 1,3 nM hTSLP, bzw. 3,7 nM hNGF- β . Es folgt die Messung der induzierten Lumineszenz mittels Luciferase-Assay. Gezeigt wird der Stimulationsfaktor. Es werden die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen gezeigt. (Abbildung aus [152])

transkriptionale Aktivität der STATs reduziert, was den Schluss zulässt, dass die Aktivierung der STATs direkt von der Phosphorylierung der Janus-Kinasen abhängt. Ein unspezifischer Einfluss des JAK-Inhibitors auf die Phosphorylierung und Aktivierung von STATs konnte in einem Nebenexperiment ausgeschlossen werden. Hierzu wurde ein Hybridrezeptor (Trk/Met-Rezeptor) verwendet, welcher sich durch humanes NGF β stimulieren lässt und durch die intrazelluläre Domäne der Rezeptortyrosinkinase c-Met eine STAT3-Aktivierung ohne Beteiligung von Janus-Kinasen auslöst. Die Zugabe des Inhibitors P6 zeigte in vergleichbarer Konzentration im Reporter-Gen-Assay keine signifikante Inhibition der STAT3-Aktivität. Aus den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche lässt sich schließen, dass bei dem untersuchten Signalweg ein weiterer Vertreter des JAK/STAT-Signalwegs gefunden wurde, welcher von schon für viele Zytokin-Rezeptoren beschrieben wurde ([80]).

3.1.2 Untersuchungen zur Beteiligung potentiell funktionaler Elemente an der Signaltransduktion des TSLP-Rezeptors

Ausgehend von den bisherigen eigenen Daten kann angenommen werden, dass die Signalweiterleitung des TSLP-Rezeptors über Phosphorylierung von Janus-Kinasen vermittelt wird, welche verschiedenen Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie aktivieren. Veröffentlichte Daten zeigen allerdings keine Aktivierung der Janus-Kinasen für den murinen Rezeptor. Für den humanen Rezeptor wurde eine Aktivierung von JAK1 und JAK2, wie in der vorliegenden Arbeit aufgeklärt, ebenfalls nicht gezeigt ([59]). Zur Bestärkung der eigenen

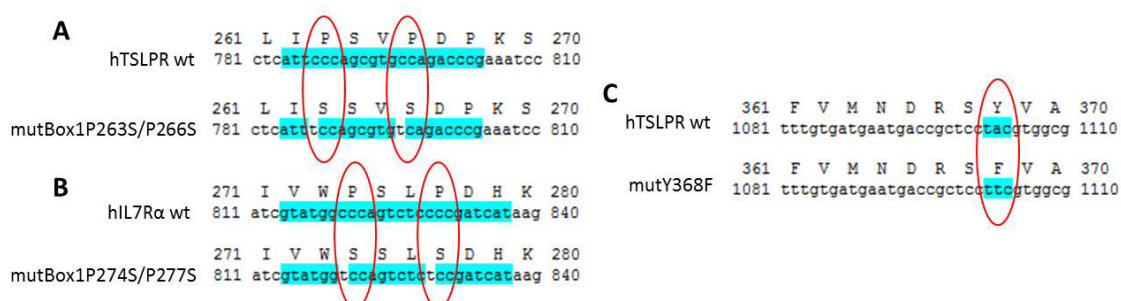


Abbildung 6: Darstellung der Basen- und Aminosäuresequenz des mutierten Ausschnitts der humanen TSLPR α - und IL-7R α -Kette. Verglichen wird jeweils ein Ausschnitt der unveränderten Sequenz (wt) mit der mutierten Sequenz (mut). Die relevanten Bereiche sind rot markiert. Grau markiert sind die Bereiche der Box1-Domänen der TSLPR α -Kette (A) und der IL-7R α -Kette (B), sowie der Tyrosin-Phosphorylierungsstelle der TSLPR α -Kette (C).

Untersuchungen sollten im vorliegenden Teil der Arbeit bestimmte funktionale Bereiche der intrazellulären Domäne des TSLP-Rezeptors mutiert werden, um deren Rolle bei der TSLP-induzierte Signalweiterleitung zu untersuchen. Zunächst sollte geklärt werden, inwiefern der Tyrosinrest der TSLPR α -Kette an der Signalweiterleitung des TSLP-Rezeptors beteiligt ist. Generell kann diese Aminosäure durch aktivierte JAKs phosphoryliert werden, wenn durch eine Liganden-Bindung eine Phosphorylierung der rezeptorassoziierten Janus-Kinasen induziert wurde. Das phosphorylierte Tyrosin dient dann als Bindungsstelle für die SH2-Domänen der Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie, welche wiederum durch räumliche Nähe zu den

aktivierten JAKs phosphoryliert und damit aktiviert werden. Um der Frage nach der Beteiligung des Tyrosins in der TSLPR α -Kette nachzugehen, wurde mittels PCR die Aminosäure Tyrosin an der Stelle 368 gegen ein Phenylalanin ausgetauscht, wodurch die Bindung der STATs an die Rezeptorkette unterbunden wird. Hierzu wurde die gesamte TSLP-Rezeptorkette erneut von dem Expressionsplasmid der nativen Rezeptorkette unter Verwendung eines mutierten *revers*-Primers kloniert, welcher an der entsprechenden Stelle die Information für die neue AS trug (dazu verwendete Primer siehe Kapitel 6.1, Seite IX). Die erfolgreiche Mutation wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die veränderte AS-Sequenz ist schematisch in Abbildung 6/C dargestellt. Das resultierende Expressionskonstrukt wird als pcDNA3.1-hTSLPR α -mutY368F bezeichnet. Die Expression auf der Zelloberfläche der Zelllinie BaF3 wurde anhand des n-terminalen P5D4-Tags zytometrisch nachgewiesen (siehe Abbildung 7).

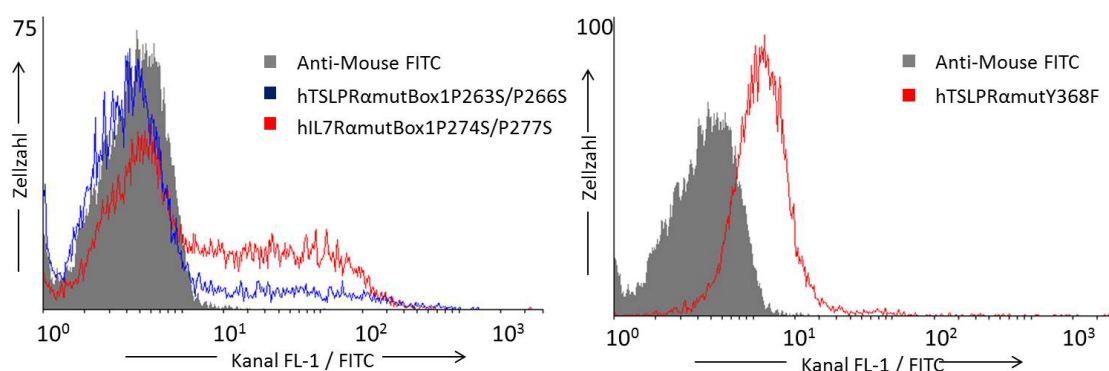


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Analyse der zellulären Expression der mutierten Varianten der humanen TSLPR α - und IL-7R α -Ketten Die Plasmide für die mutierten Varianten der TSLP-Rezeptorketten wurden in BaF3-Zellen transfiziert und deren Expression nach 24 h zytometrisch bestimmt. Hierzu wurde als primärer Antikörper α P5D4 eingesetzt, welcher den n-terminalen P5D4-Tag bindet, dieser wiederum wird erkannt von dem sekundären Antikörper goat-anti-mouse-FITC. Die Expression der Rezeptorketten ist somit im Fluoreszenzkanal 1 (FL-1) detektierbar. Die Färbung mit Anti-Mouse-FITC allein dient der Kontrolle auf unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers.

Im anschließenden Reporter-Gen-Assay wurde die durch TSLP-Stimulation induzierte genregulatorische Aktivität von STAT1/3 und 5 untersucht (siehe Abbildung 8). Im Vergleich zu dem nativen TSLP-Rezeptor konnte allerdings für keine der drei untersuchten Transkriptionsfaktoren eine deutliche Veränderung der Aktivität gemessen werden, woraus zu schließen ist, dass der Tyrosinrest der TSLPR α -Kette nicht an der Aktivierung dieser STATs beteiligt ist.

Tanner et al. beschrieben 1995, dass die Assoziation der Januskinasen an Zytokin-Rezeptoren über die Box1-Domäne realisiert wird. Diese Domäne schließt sich intrazellulär unmittelbar an die Transmembrandomäne an und besteht aus einem hochkonservierten Bereich von 6 Aminosäuren (PXXPPX). Kritisch für die Bindung der assoziierten Janus-Kinasen sind hierbei die ersten beiden Proline ([138]). Durch deren Austausch kann die Bindung der JAKs verhindert werden. Um die Daten aus den Western Blots zur Phosphorylierung der Janus-Kinasen durch TSLP-Stimulation zu untermauern, sollte die Aktivierung der STAT-Transkriptionsfaktoren in

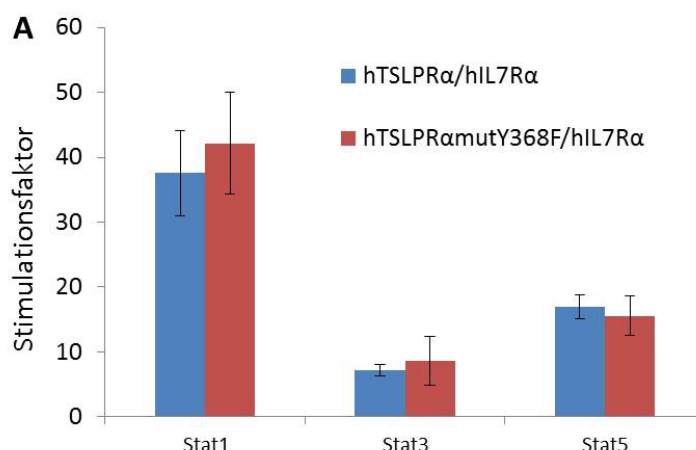


Abbildung 8: Einfluss auf die hTSLP-induzierte STAT-Aktivität durch Austausch des Tyrosin an der Position 368 in der TSLPR α -Kette gegen Phenylalanin Zytokinstarvierte BaF3-Zellen wurden mit den dargestellten Kombinationen an Rezeptorketten und jeweils verschiedenen STAT-spezifischen Reporter-Gen-Konstrukten transfiziert und mit 1,3 nM hTSLP stimuliert. Die Auswertung nach 12 h erfolgte mittels Luciferase-Assay nach Standardprotokoll. Dargestellt sind jeweils die Stimulationsfaktoren, berechnet aus dem Verhältnis der stimulierten zur unstimulierten Probe. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

Abhängigkeit vom intakten Vorhandensein der Box1-Domänen an der TSLPR α - wie auch an der IL-7-R α -Kette untersucht werden. Hierzu wurden zunächst die ersten beiden Proline der Box1-Domäne mittels *site-directed*-Mutagenese-PCR durch die Aminosäure Serin ausgetauscht (dazu verwendete Primer siehe Kapitel 6.1, Seite IX). Die Sequenz der wildtypischen und der mutierten Box1-Domäne der beiden TSLP-Rezeptorketten sind in Abbildung 6 dargestellt. Die generierten mutierten Ketten wurden mittels Sequenzierung überprüft und mit hTSLPR α -mutBox1P263S/P266S und hIL-7-R α -mutBox1P274S/P277S (folgend abgekürzt mit hTSLPR α -mutBox1-2P und hIL-7-R α -mutBox1-2P) bezeichnet. Die Expression der Rezeptorketten nach Transfektion auf BaF3-Zellen wurde zytometrisch unter Verwendung des n-terminalen P5D4-Tags nachgewiesen (siehe Abbildung 7). Ebenso wurde überprüft, ob die wildtypischen und mutierten Rezeptorketten in gleichem Maße auf der Zelloberfläche exprimiert werden. BaF3-Zellen wurden anschließend mit den 4 möglichen Varianten des TSLP-Rezeptors transfiziert: in der wildtypischen Kombination (hTSLPR α -wt + hIL-7-R α -wt), jeweils einmal mit einer mutierten und einer nativen Rezeptorkette (hTSLPR α -mutBox1 + hIL-7-R α -wt bzw. hTSLPR α -wt + hIL-7-R α -mutBox1) und als Kombination beider mutierter Ketten (hTSLPR α -mutBox1 + hIL-7-R α -mutBox1).

Diese Kombinationen wurden jeweils mittels Reporter-Gen-Analyse hinsichtlich ihres Vermögens untersucht, verschiedene STATs (STAT1 / STAT3 und STAT5) zu aktivieren. Dabei zeigten sich für alle drei Transkriptionsfaktoren ähnliche Effekte. Dargestellt sind in Abbildung 9 die Stimulationsfaktoren als Verhältnis der stimulierten Probe (hTSLP 1,3 nM) zur unstimulierten Probe. Hierbei konnte die wildtypische Variante für STAT1, STAT3 und STAT5 eine entsprechende Stimulation um den Faktor 49, respektive 7.5 bzw. 4.5 induzieren. Nach Austausch der Box1-Domäne der TSLPR α -Kette ließ sich für alle 3 Transkriptionsfaktoren keine induzierte

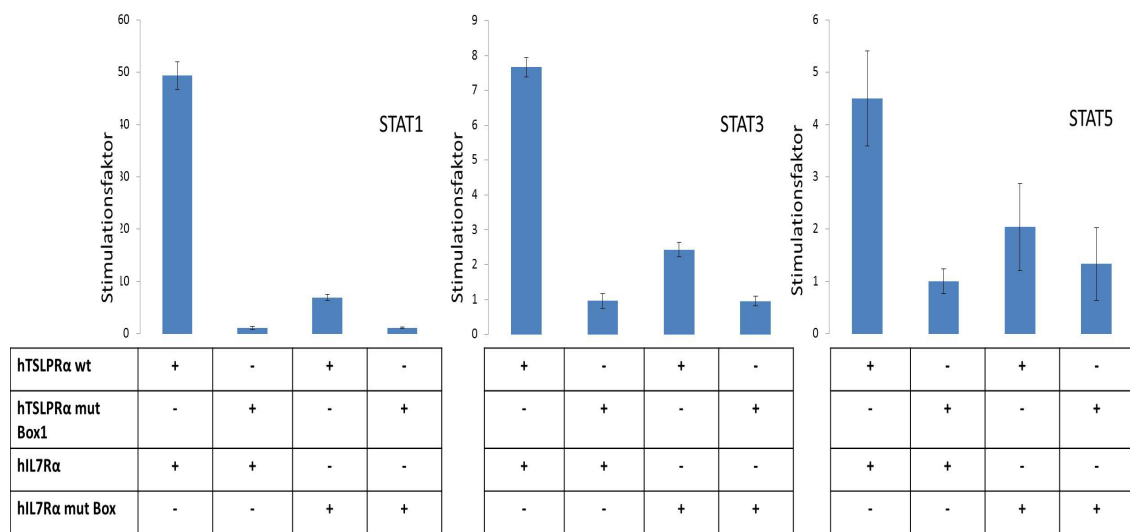


Abbildung 9: Einfluss der Mutation der JAK-bindenden Box-1-Domäne auf die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren Die dargestellten Rezeptorvarianten wurden zusammen mit den STAT-spezifischen Reportergenkonstrukten für STAT1, STAT3 und STAT5 in zuvor für 6 h starvierte BaF3-Zellen transfiziert und mit 1,3 nM hTSLP stimuliert. Die Auswertung nach 12h erfolgte mittels Luciferaseassay. Dargestellt sind jeweils die Stimulationsfaktoren, berechnet aus dem Verhältnis der stimulierten zur unstimulierten Probe. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen

Aktivität messen. Die Kombination der wildtypischen TSLP α -Kette mit der mutierten Variante der IL-7 α -Kette induzierte noch eine geringe Aktivität (Faktor 6,9 für STAT1, Faktor 2,4 für STAT3 und Faktor 2 für STAT5). Die Kombination beider mutierter Rezeptorketten konnte gar keine Aktivierung der STATs auslösen. Diese Erkenntnisse bestätigen die Beteiligung der Janus-Kinasen an der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3 und STAT5. Ein einzelner Austausch des ersten und des zweiten Prolins der Box1-Domäne ergab gleiche, wenn auch etwas abgeschwächte Effekte. Die Fähigkeit der Rezeptoren, JAKs zu binden und damit STATs zu aktivieren, reduzierte sich deutlich, wenn beide Proline gleichzeitig ausgetauscht wurden. Die Mutation des dritten Prolins wurde nicht durchgeführt, Tanner et al. beschrieben hier keine weitere Reduktion der Aktivierung (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Vergleichende Untersuchungen zur Signalweiterleitung des humanen und des murinen TSLP-Rezeptors

Ausgehend von diesen Daten sollte untersucht werden, inwiefern sich das Signaling des murinen und humanen TSLP-Rezeptors unterscheiden. Diese Frage zu beantworten ist wichtig, um herauszufinden, inwiefern das murine Rezeptorsystem und Forschungsergebnisse aus Mausmodell-Experimenten auf das menschliche System übertragen werden können. Hierzu wurde zunächst die Signalweiterleitung unter Verwendung der nativen Rezeptoren, später unter Verwendung von Hybridrezeptoren auf Transkriptionsebene verglichen. Während die Expressionsplasmide für die humanen Rezeptorketten aus den vorherigen Versuchen bereits vorhanden waren, mußten die Rezeptorketten des murinen TSLP-Rezeptors (mTSLP α und mIL-7 α) noch kloniert werden. Hierzu konnte als Template murine cDNA verwendet werden,

gewonnen aus der mRNA muriner PBMCs. Die genetische Information der extrazellulären, intrazellulären und Transmembran-Domäne der beiden Ketten wurden mit spezifischen Primern (siehe Kapitel 6.1, Seite IX) amplifiziert und anschließend in das Expressionskonstrukt pcDNA3.1neo-IL4SP-P5D4 (siehe Plasmidkarte, Kapitel 6.3) über die Restriktionsenzyme *XhoI* und *XbaI* ligiert. Dadurch wurde das Rezeptorspezifische Signalpeptid zur besseren Expression durch das Signalpeptid der humanen IL-4R α -Kette ersetzt und außerdem ein P5D4-Tag zur zytometrischen Expressionskontrolle eingefügt. Die entstandenen Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft und als pcDNA3.1-mTSLPR α und pcDNA3.1-mIL-7R α bezeichnet. Die zytometrische Überprüfung der Expression der Rezeptorketten erfolgte auf BaF3-Zellen unter Verwendung des α -P5D4-Antikörpers als primären Antikörper (siehe Abbildung 10).

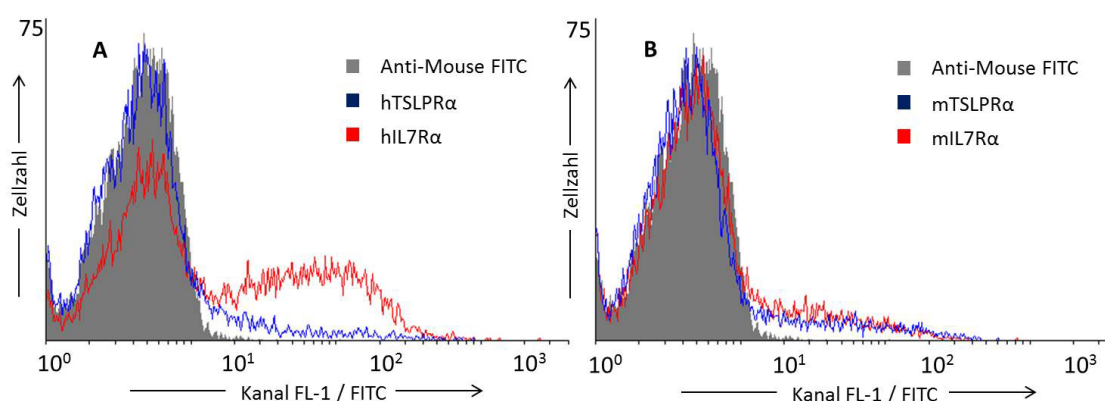


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse der zellulären Expression der Rezeptorketten des humanen und murinen TSLP-Rezeptors BaF3-Zellen wurden mit den Rezeptorketten des humanen (A) und murinen (B) TSLP-Rezeptors transfiziert. Die Expression auf der Zelloberfläche wurde nach 24 h mittels einem Antikörper gegen den n-terminalen P5D4-Tag nachgewiesen, dieser wurde mit einem sekundären Antikörper (goat-anti-mouse-FITC) angefärbt. Die Expression wird im Fluoreszenzkanal 1 (FL-1) detektiert. Die Färbung mit anti-mouse-FITC allein dient der Kontrolle auf unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers. Die Verschiebung der roten und blauen Fluoreszenzkurven im Histogramm nach rechts zeigt die verstärkte Intensität der Fluoreszenz, welche aus einer spezifischen Bindung des primären und sekundären Antikörpers an den P5D4-Tag resultiert und ist damit ein Nachweis der Expression der Rezeptorketten.

Daraus ist erkennbar, dass die murine TSLPR α -Kette im Vergleich zur humanen Kette geringer exprimiert wird, die IL-7R α -Ketten (murine/human) zeigen eine starke Expression auf der Zelloberfläche. Die Daten des Reportergen-Assays zeigen (siehe Abbildung 11), dass in BaF3-Zellen, welche sowohl mit dem humanen TSLP-Rezeptor, als auch mit dem murinen TSLP-Rezeptor transfiziert wurden, die Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3 und STAT5 eine verstärkte Aktivität aufweisen. Im Vergleich zwischen den Spezies ist allerdings sichtbar, dass die Aktivierung im humanen System etwas stärker ausfällt, die Stimulationsfaktoren sind hier in der Gesamtheit um ca. 30% erhöht.

Im Folgenden sollte der Fokus der Untersuchungen verstärkt auf das intrazelluläre Signaling gelegt werden. Dazu wurde der Versuchsaufbau so gewählt werden, dass Unterschiede im Signaling ausschließlich durch die intrazellulären Domänen hervorgerufen werden. Der Einfluss der extrazellulären Domänen und der spezifischen Liganden sollte nach Möglichkeit minimiert

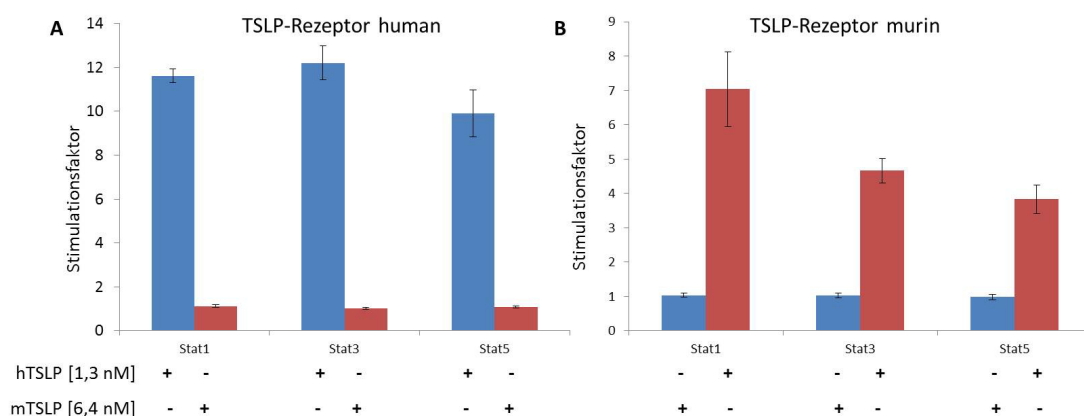


Abbildung 11: Durch den humanen und murinen TSLP-Rezeptor vermittelte zytokininduzierte STAT-Aktivierung BaF3-Zellen wurden nach 6 h Zytokin-Starvierung mit den humanen (A) oder murinen (B) Rezeptorketten des TSLP-Rezeptors und STAT-spezifischen Reportergen-Konstrukten transient transfiziert und anschließend mit humanem und murinem TSLP stimuliert. Die Messung der transkriptionalen Aktivität der verschiedenen STATs erfolgt mittels Luciferaseassay (siehe Methoden). Dargestellt sind die Stimulationsfaktoren welche sich aus dem Verhältnis von stimulierter zu unstimulierter Probe ergeben. Dargestellt ist ein typisches Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

werden. Hierzu kann generell der Ansatz eines chimären Rezeptors gewählt werden, indem die extrazellulären, transmembranen oder intrazellulären Domänen eines Rezeptors gegen die eines anderen ausgetauscht werden. ([127], [103]).

Bereits in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Umleitung eines zytokininduzierten Signals durch die wahlweise Kombination von extra- und intrazellulären Domänen zu einem Rezeptorhybrid ermöglicht werden kann. So kann ein schwer quantifizierbares intrazelluläres Signaling auf einen bekannten, gut charakterisierten Signalweg umgeleitet werden. Dazu wurden die extrazellulären Domänen des humanen IL-13-Rezeptors an die intrazellulären signalweiterleitenden Domänen des humanen IL-4-Rezeptors fusioniert. Damit konnte erreicht werden, dass eine Stimulation des Rezeptorsystems mit hIL-13 in einer Aktivierung des nativ durch hIL-4 induzierten Signalwegs über die Aktivierung von STAT6 erfolgte ([69]). Ausgehend von diesen Kenntnissen sollte ein Rezeptorhybrid entwickelt werden, welches das Signaling des murinen, bzw. des humanen TSLP-Rezeptors unter Verwendung eines unabhängigen extrazellulären Rezeptor-Liganden-Systems induziert. Hierzu sollten ebenfalls die extrazellulären Domänen des humanen IL-13-Rezeptors (hIL-13R α und hIL-4R α) genutzt werden.

Beispielhaft ist die Klonierung des hIL-13R/TSLPR-Hybridrezeptors schematisch in Abbildung 12 gezeigt, durch die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten von intra- und extrazellulärer Domäne sind pro Spezies vier Hybrid-Rezeptorketten entstanden. Sämtliche Rezeptor-Varianten sind in Abbildung 13 zusammengefasst. Die verwendeten Primer sind in siehe Kapitel 6.1, Seite IX aufgeführt. Das Plasmidrückgrat aller Konstrukte basiert auf dem Expressionsplasmid pcDNA3.1-Neo.

Für beide Spezies wurden die zwei möglichen Hybridvarianten (Variante 1: IL-13R α Ex/TSLPR α Int und IL-4R α Ex/IL-7R α Int bzw. Variante 2: IL-13R α Ex/IL-7R α Int und IL-4R α Ex/TSLPR α Int) in BaF3-Zellen transfiziert und mit jeweils 3,8 nM hIL-13 stimuliert.

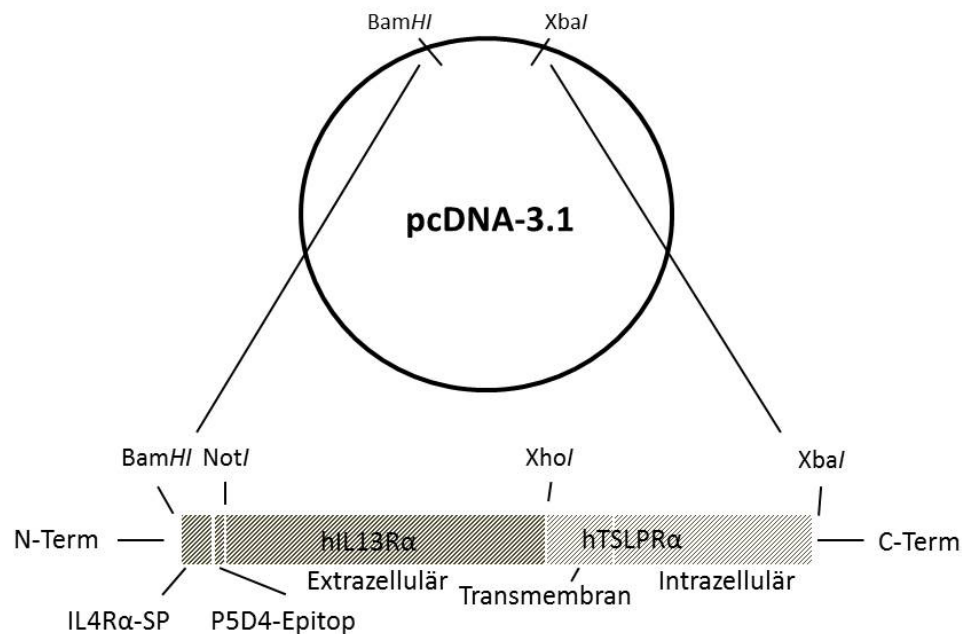


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Klonierung der hIL-13Rex/TSLP Rint-Rezeptorfusionen N-Terminal trägt der Rezeptor das Signalpeptid der hIL-4Rα1-Rezeptorkette, verantwortlich für den zellulären Transport. Das P5D4-Epitop dient der Detektion der Rezeptorkette auf der Zelloberfläche. Dargestellt ist die Fusionsvariante mit der extrazellulären Domäne der hIL-13Rα-Kette und der Transmembran- und intrazellulären Domäne der hTSLP Rα-Kette. Die zur Restriktion und Ligation eingesetzten Restriktionsenzyme und Erkennungssequenzen sind ebenfalls dargestellt. An diesen Stellen erfolgt der Austausch der extrazellulären Domäne hIL-13Rα gegen hIL-4Rα. Intrazellulär erfolgt der Austausch gegen die humane IL-7Rα-Kette sowie gegen die Ketten des murinen TSLP-Rezeptors, mTSLP Rα bzw. mIL-7Rα. Die daraus entstehenden Kombinationen sind in Abbildung 13 schematisch dargestellt. Die Klonierung erfolgt im Expressionskonstrukt pcDNA3.1-Neo (Sequenz siehe Anhang, Kapitel 6.3)

Es konnte dabei jeweils festgestellt werden, dass Variante 2 (hIL-13RαEx/(h/m)IL-7RαInt und hIL-4RαEx/(h/m)TSLP RαInt) deutlich bessere Stimulationsfaktoren lieferte (Daten nicht gezeigt). Daraus folgend wurde für die Untersuchungen im Reporter-gen-Assay jeweils diese Kombination transfiziert. Wie auch schon für die Signalweiterleitung der nativen Rezeptoren gezeigt, liess sich für beide Spezies eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3 und STAT5 nachweisen. Jedoch zeigte sich die Stärke der Aktivierung für den murinen Rezeptor deutlich verringert. Ein Einfluss der Transfektionseffizienz der Rezeptoren und der Reporter-gen-Konstrukte auf die transkriptionale Aktivität kann allerdings aufgrund der Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses ausgeschlossen werden. Zur Kontrolle auf Erfolg der Transfektion wurden die Zellen mit 640 pM mIL-3 stimuliert, durch die Stimulation von untransfizierten Zellen mit hIL-13 konnte zuvor ein unspezifischer Einfluss von hIL-13 ausgeschlossen werden. Humanes und murines TSLP zeigten ebenfalls keinen Einfluss auf die STAT-Aktivität (Daten nicht dargestellt).

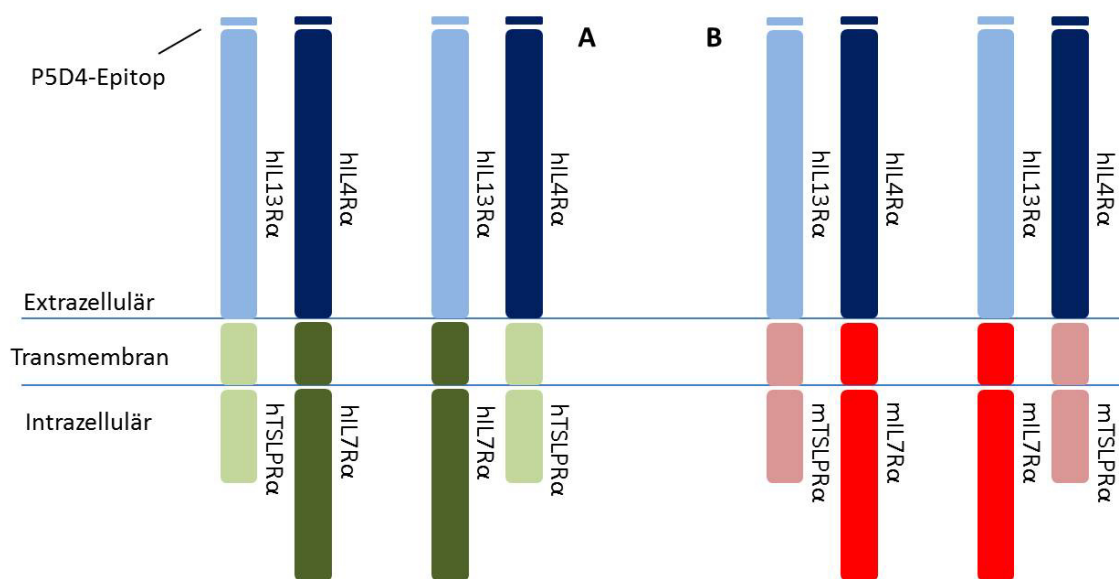


Abbildung 13: Schematische Darstellung der möglichen Kombinationen bei der Fusion des humanen IL-13-Rezeptors mit dem humanen und murinen TSLP-Rezeptor. Die extrazellulären Domänen der Rezeptorketten des humanen IL-13-Rezeptors (hIL-4R α und hIL-13R α) werden jeweils mit der Transmembran- und der intrazellulären Domäne des humanen (A) und murinen (B) TSLP-Rezeptors fusioniert. Dies erfolgte durch Klonierung, Restriktion und Ligation der entsprechenden Abschnitte in ein Plasmid zur nachfolgenden zellulären Expression. N-terminal befindet sich an allen Ketten ein P5D4-Tag, der von einem spezifischen Antikörper (α P5D4) zur zytometrischen Expressionsdetektion gebunden werden kann (siehe Abbildung 14).

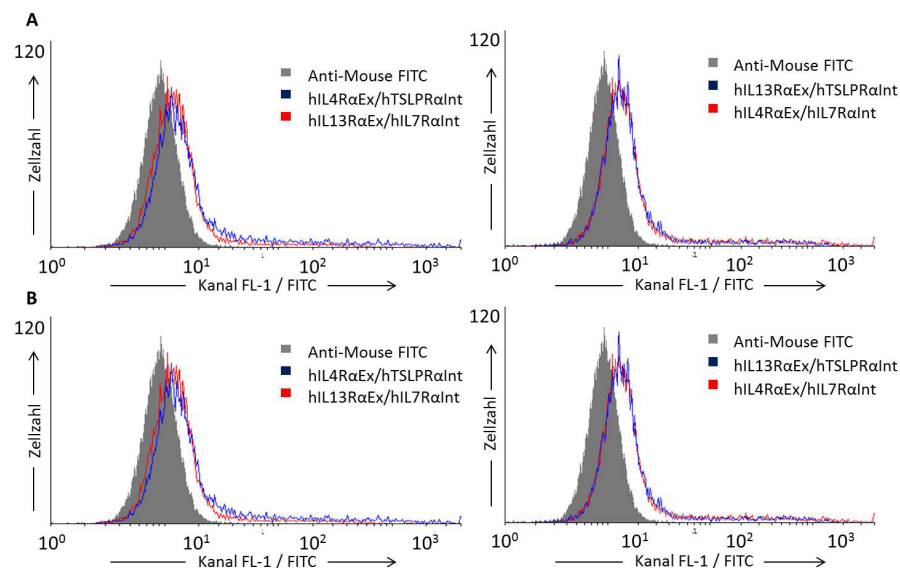


Abbildung 14: Zytometrische Analyse der Expression der IL-13Rex/TSLP-Rint-Hybridrezeptorketten auf BaF3-Zellen. Die Expressionkonstrukte für die Hybridvarianten des humanen (A) und des murinen (B) TSLP-Rezeptors wurden in BaF3-Zellen transfiziert. Die Verschiebung der roten und blauen Kurve in Richtung der höheren Fluoreszenzintensität zeigt die Expression auf der Zelloberfläche der BaF3-Zellen. Die Färbung mit anti-Mouse-FITC allein dient der Kontrolle auf unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers.

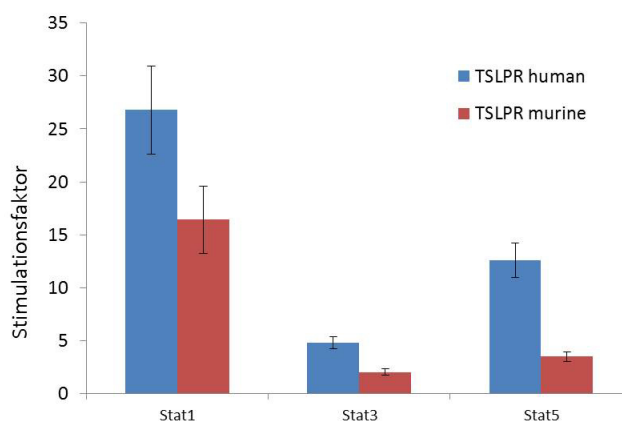


Abbildung 15: interspezies-Vergleich der TSLP-induzierten transkriptionalen Aktivität verschiedener STATs Starvierte BaF3-Zellen wurden jeweils mit Reporter-Gen-Plasmid (STAT1: pGL3-CIS-luc / STAT3: pGL3-SOCS3-luc / STAT5: pGL3-CIS-luc) und Rezeptorketten-Expressionsplasmiden (vergleiche Abbildung 13) durch Elektroporation transfiziert. Es wurden die folgenden Rezeptorfusionen transfiziert: TSLPR human bestehend aus hIL-4R α Ex/hTSLPR α Int + hIL-13R α Ex/hIL-7R α Int, TSLPR murin bestehend aus hIL-4R α Ex/mTSLPR α Int + hIL-13R α Ex/mIL-7R α Int. Die Zellen wurden anschließend mit 3,8 nM hIL-13 stimuliert und mittels Luciferase-Assay luminometrisch ausgewertet. Dargestellt ist das Verhältnis der Lumineszenz der stimulierten zur unstimulierten Probe. Gezeigt wird ein repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Versuchen.

3.1.4 Zusammenfassung

Im vorliegenden Teil sollte die Signalweiterleitung des murinen und des humanen TSLP-Rezeptors genauer untersucht werden. Die bis dahin publizierten Daten weisen in beiden Spezies auf eine Aktivierung von STAT5 hin, weitere Signalmoleküle konnten teilweise gezeigt, von anderen Gruppen aber nicht bestätigt werden. Anhand der eigenen Ergebnisse konnte unter Verwendung der Modellzelllinie BaF3, welche stabil den TSLP-Rezeptor exprimiert, eine zusätzliche Aktivierung von JAK1, JAK2, STAT1 und STAT3 gezeigt werden. Die Transkriptionsfaktoren STAT1, 3 und 5 wurden im murinen System ebenfalls aktiviert. Untersuchungen zur Beteiligung von Janus-Kinasen stehen hier noch aus. Zur Bekräftigung der Daten, welche eine Beteiligung der Janus-Kinasen im humanen System postulieren, wurden die JAK-bindenden Box1-Domänen mutiert und deren Effekt auf die STAT-Aktivierung untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche bestätigen die Vermutung, dass der TSLP-Rezeptor intrazelluläre Signale vorwiegend über den JAK-STAT-Signalweg weiterleitet. Die Frage nach der Übertragbarkeit von Forschungsergebnissen aus dem murinen auf das humane Rezeptorsystem kann durch die vorliegenden Versuche positiv beantwortet werden.

3.2 Der Ox40-Ligand und sein Promoter als TSLP-Zielstruktur

Um die genregulatorische Aktivität der TSLP-Rezeptor-assoziierten Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3 und STAT5 auch direkt an einem Targetgen des TSLP-induzierten Signalwegs zu bestätigen, sollte ihr Einfluss auf die Transkription des Gens für den Ox40-Liganden (Ox40L, auch Glycoprotein 34, gp34 genannt) untersucht werden. Ihre Aktivierung konnte bereits im murinen Modellsystem der BaF3-Zellen gezeigt werden, diese TSLPR-transfizierten Zellen zeigten nach TSLP-Stimulation eine Aktivierung der genannten STATs nach Phosphorylierung von JAK1 und JAK2 ([152]).

3.2.1 Etablierung eines Reporter-gen-basierten Systems zur Untersuchung der TSLP-induzierten Aktivierung des Ox40L-Promoters

Zur genaueren Untersuchung der Ox40L-Induktion nach TSLP-Stimulation sollte zunächst ein Reporter-gen-Konstrukt generiert werden. Als Backbone hierfür wurde das Reporter-gen-Plasmid pGL4.26 (Plasmidkarte siehe Anhang, Kapitel 6.3) verwendet, welches nach einer *Multi-Cloning-Site*, über welche der zu untersuchenden Promoter eingefügt werden kann, eine Sequenz für die *firefly*-Luciferase anfügt. Damit unterliegt die Transkription der Luciferase der Kontrolle des eingefügten Promoters und dessen Aktivierung durch den induzierten Signalweg. Das produzierte Enzym Luciferase kann im Luciferase-Assay Luciferin als Substrat umwandeln, wobei durch die Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin emittiertes Licht luminometrisch detektiert werden kann. In der zu untersuchenden Fragestellung soll die vollständige Promoterregion des Ox40-Liganden in dieses Konstrukt eingebaut werden, um den Einfluss der TSLP-induzierten Signalweiterleitung des TSLP-Rezeptors auf dessen Expression auch genregulatorisch zu bestätigen. Die Sequenz für die Promoterregion wurde zunächst aus einer Patentschrift entnommen (Patentnummer EP 1 448 781 B1, Titel: Verfahren zur Identifizierung von Zielepitopen der T-Zell-vermittelten Immunantwort und zum Nachweis Epitop-spezifischer T-Zellen). Bestätigt wurde diese Sequenz durch den PubMed-Eintrag AB007839 (Homo sapiens gp34 gene for glycoprotein 34, regulatory region), welcher ebenfalls die 979 Basenpaare (bp)-große Promoterregion des Ox40-Liganden beschreibt.

Es wurde zunächst die vollständige Promoterregion des Ox40L aus humaner, genomischer DNA kloniert (verwendete Primer siehe Kapitel 6.1, Seite IX). Ihre DNA-Sequenz wurde mittels Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft und anschließend über die Schnittstellen *KpnI* und *HindIII* in die *Multi-Cloning-Site* des Reporter-gen-Plasmids pGL4.26 eingefügt. Das entstandene Reporter-gen-Konstrukt wird pGL4.26-Ox40LProm-fl (*fulllength*) bzw. pGL4.26-Ox40LProm-950bp genannt. Zur Untersuchung der TSLP-induzierten Ox40L-Expression wurde das generierte Reporter-Konstrukt in die TSLP-Rezeptor-exprimierende Zelllinie BaF3-TSLPR transfiziert. Die Zellen wurden zuvor für 8 h starviert und nach der Transfektion mit verschiedenen Konzentrationen humanem TSLP (0,033 – 33,3 nM) stimuliert. Anhand der Daten lässt sich eine dosisabhängige Aktivierung des Promoters erkennen, bis zu einem Stimulationsfaktor von ca. 20 bei einer TSLP-Konzentration von 6,7 nM (siehe Abbildung 16). Hiermit kann eine deutliche Aktivierung

des Ox40L-Promoters nach TSLP-Stimulation gezeigt und daraus geschlossen werden, dass die Stimulation des TSLP-Rezeptors direkt die Expression des Ox40L kontrolliert.

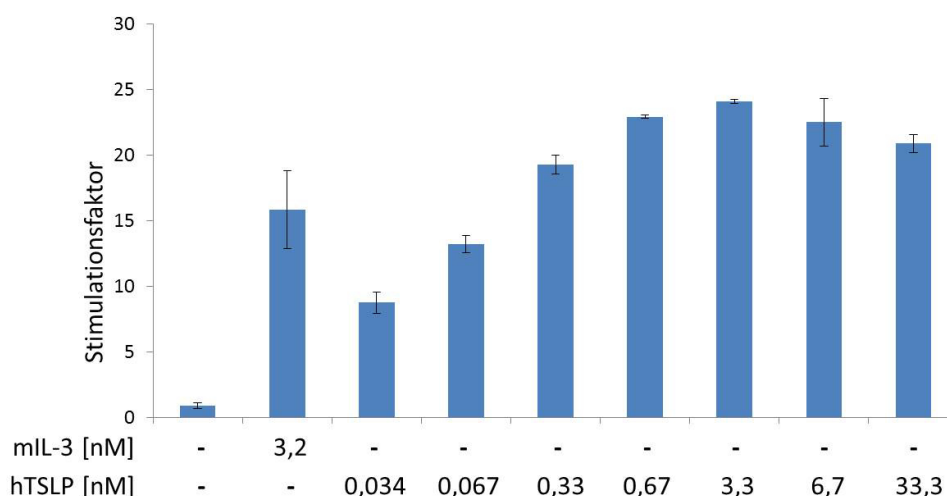


Abbildung 16: Reportergenanalyse zur Analyse der hTSLP-vermittelten Stimulation des vollständigen Ox40L-Promoters in BaF3-TSLPR-Zellen BaF3-TSLPR-Zellen wurden für 6 h zytokin-starviert und anschließend durch Elektroporation mit den Vollängen-Reporterkonstrukt des Ox40L-Promoters pGL4.26-Ox40LP-950bp-luc transfiziert. Es folgte eine 12-stündige Stimulation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen hTSLP. Die Bestimmung der transkriptionalen Aktivität erfolgte mittels Luciferase-Assay. Es ist der Stimulationsfaktor dargestellt, gebildet aus dem Verhältnis der relativen Lumineszenz der stimulierten zur unstimulierten Probe. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

3.2.2 Untersuchungen zur Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der TSLP-induzierten Aktivierung des Ox40L-Promoters

Um die direkte Wirkung der TSLPR-induzierten Signale auf den Promoter des Ox40L besser zu verstehen, sollte zunächst der Promoter genauer untersucht werden. Die Suche nach Bindungsstellen würde die Frage beantworten, über welche Transkriptionsfaktoren der Promoter aktiviert wird. Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen zum TSLP-induzierten Signalweg wäre das Auffinden von Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3 oder STAT5 zu vermuten.

Es sollte zunächst geklärt werden, in welchem Bereich der Promotersequenz sich die für dessen Aktivierung verantwortlichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren befinden. Hierzu wurden ausgehend von dem wildtypischen Promoter veränderte Varianten kloniert, welche um jeweils 100 bp am *upstream*-Bereich der Sequenz verkürzt wurden (verwendete Primer siehe Kapitel 6.1, Seite IX). Dabei konnten zusätzlich zum wildtypischen Promoter (-950bp bzw. fl) 8 weitere Varianten generiert werden, welche sich nun in der Länge der Sequenz *upstream* vom Transkriptions-Startpunkt des Gens für den Ox40-Liganden unterscheiden. Diese wurden ebenfalls in das Reporter-Konstrukt pGL4.26 ligiert. Diese Konstrukte wurden durch Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft und pGL4.26-Ox40LProm-800bp, pGL4.26-Ox40LProm-700bp, bis hin zu pGL4.26-Ox40LProm-100bp genannt (siehe Abbildung

17).

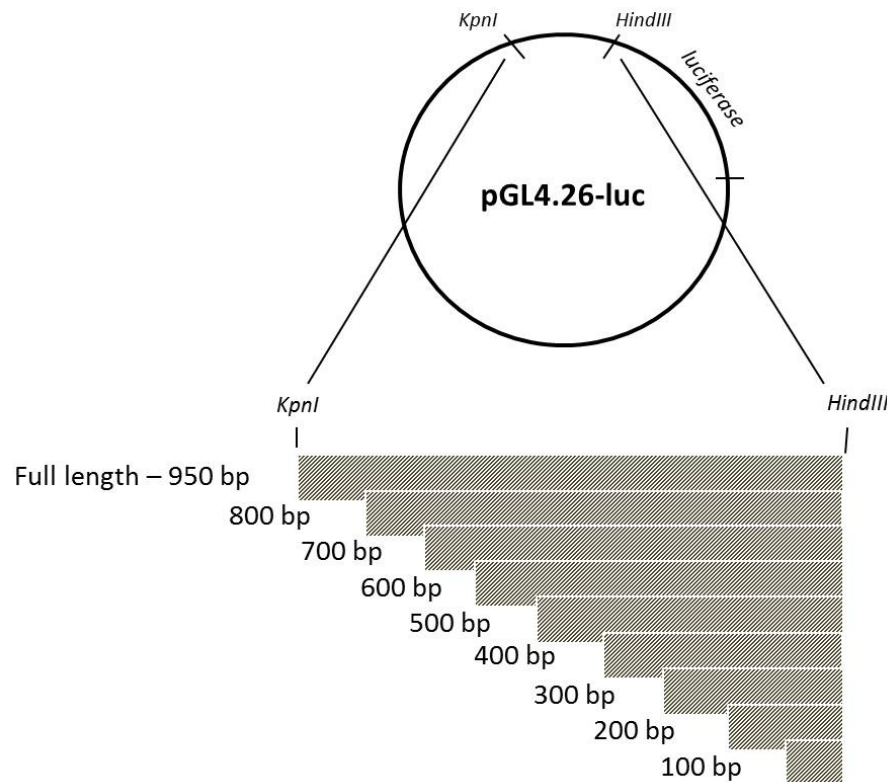


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Klonierung des Ox40L-Promoters und seiner verschiedenen Fragmente in das Plasmid pGL4.26-luc Der vollständige Promoter des Ox40L-Gens wurde aus humaner genomischer DNA amplifiziert und über die dargestellten Restriktionsstellen in das Reporter-Plasmid pGL4.26 kloniert. Die verkürzten Promoterfragmente wurden unter Verwendung veränderter *forward*- und dem gleichen *revers*-Primer kloniert. Die Kürzung der Promoterregion erfolgte an der *upstream*-Region des Promoters. Der folgende Abschnitt für die Kodierung der Luciferase als Reporter-Gen auf dem Plasmid unterliegt nun der transkriptionalen Kontrolle des Ox40L-Promoters. Die generierten Plasmide tragen die Bezeichnung pGL4.26-Ox40LP-950bp-luc, bzw. pGL4.26-Ox40LP-800bp-luc, usw.

Diese Reporter-Konstrukte wurden parallel in BaF3-Zellen transfiziert, welche stabil den TSLP-Rezeptor exprimieren. Die Zellen wurden anschließend mit verschiedenen Konzentrationen hTSLP (67 – 6700 pM) stimuliert und die Aktivierung des Promoters im Luciferase-Assay bestimmt (siehe Abbildung 18). Hier zeigte sich für alle Promotoren zunächst eine dosisabhängige Aktivierung. Betrachtet man die Aktivierung der verschiedenen Konstrukte und vergleicht diese bei gleicher TSLP-Konzentration (z.B. 670 nM), lässt sich erkennen, dass ab einer Länge von 300 bp alle Konstrukte die gleiche Stärke der Aktivierung aufweisen, hier ergibt sich jeweils ein Stimulationsfaktor von ca. 10 im Vergleich zur nicht-induzierten Probe. Bei einer Verkürzung der Promotersequenz auf nur 200 bp reduziert sich der Stimulationsfaktor auf ca. 6, eine weitere Verkürzung auf 100 bp reduziert diesen auf ca. 2,5. Dieser Versuch zeigt, dass die für die Aktivierung des Promoters verantwortlichen Bindungsstellen im Bereich bis zu 300 bp *upstream* des Transkriptionsstartpunkts liegen müssen. Ein verstärkender Effekt der Promoter durch Verlängerung der Promotersequenz über 300 Basenpaare hinaus zeigt sich nicht mehr.

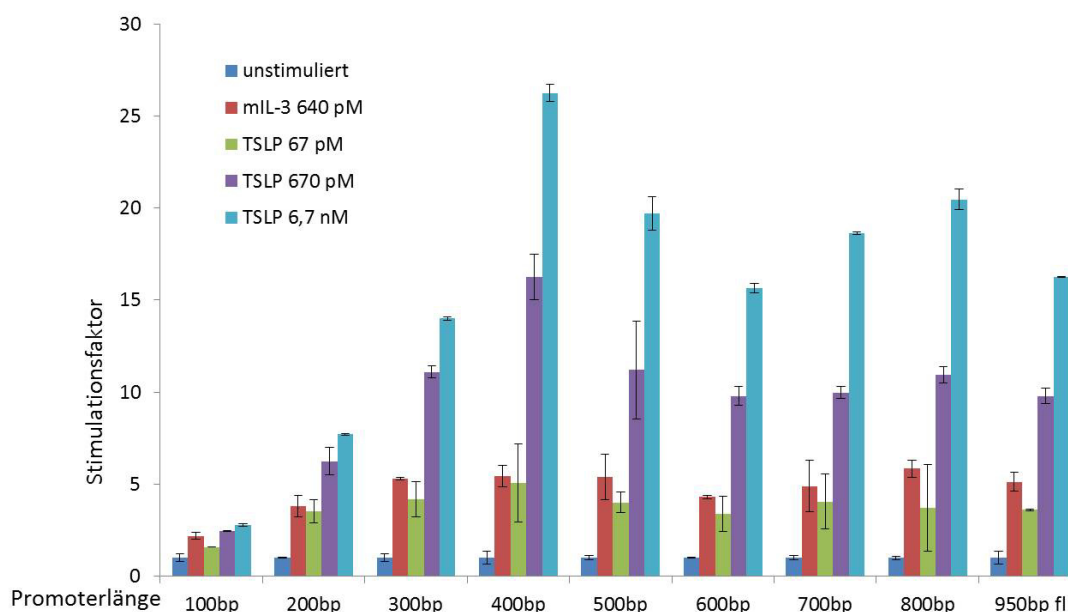


Abbildung 18: Reportergenanalyse zum Einfluss der Promoterlänge auf die TSLP-induzierte Aktivierung von Ox40L Reportergenkonstrukte, welche unterschiedlich lange Fragmente des Ox40L-Promoters (100 bp, 200 bp,..., 950 bp) einkloniert haben, wurden in zuvor für 6 h starvierte BaF3-TSLPR-Zellen transfiziert und mit 640 pM mIL-3 als Kontrolle und verschiedenen Konzentrationen hTSLP (67 pM, 670 pM, 6,7 nM) für 12 h stimuliert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Luciferase-Aktivität luminometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Stimationsfaktoren, berechnet aus den ermittelten relativen Lumineszenzeinheiten der stimulierten zur unbehandelten Probe. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

Um herauszufinden, welche Bindungsstellen in dem Bereich 300 bp stromaufwärts für die Aktivierung des Promoters verantwortlich sind, wurden zwei frei im Internet zugängliche Programme verwendet, welche Promotersequenzen hinsichtlich vorhandener Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen untersuchen. Das erste Programm (PROMO) wurde bereitgestellt von ALLGEN (Algorithmics and Genetics Group der Technischen Universität Katalonien, Spanien, <http://alggen.lsi.upc.es/>) ([92], [42]). Zur näheren Eingrenzung wurde zunächst nur nach Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren des NF κ B-, JAK/STAT- und des MAPK-Kinase-Signalwegs gesucht, Signalwege die zumeist durch Zytokinrezeptoren aktiviert werden. Die grafische Darstellung des Ergebnisses ist in Abbildung 19 zu sehen. Ausgegeben wurden für den untersuchten Bereich mögliche Bindungsstellen für AP1, bzw. c-Jun als möglichen Bestandteil des AP-1-Komplexes, sowie Mitglieder der NF κ B-Familie, NF κ B und Rel-A, außerdem mit STAT1, STAT4 und STAT5 Vertreter des JAK/STAT-Signalweges, wobei die Bindungsstellen zumeist im Bereich zwischen Transkriptionsstartpunkt und 100 bp *upstream* sowie zwischen 200 bp und 300 bp *upstream* liegen. Diese Daten decken sich zum Teil mit den Ergebnissen aus dem zweiten Programm zur Promoteranalyse. Dabei kam TFSearch zum Einsatz, zur Verfügung gestellt vom japanischen Computational Biology Research Center (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) ([51]). Hier konnten im Bereich zwischen 50 und 100 bp *upstream* ebenfalls zwei NF κ B-Bindungsstellen identifiziert werden, ebenso wie zwei Bindungsstellen für c-Rel, ein weiterer Transkriptionsfaktor aus der NF κ B-Familie.

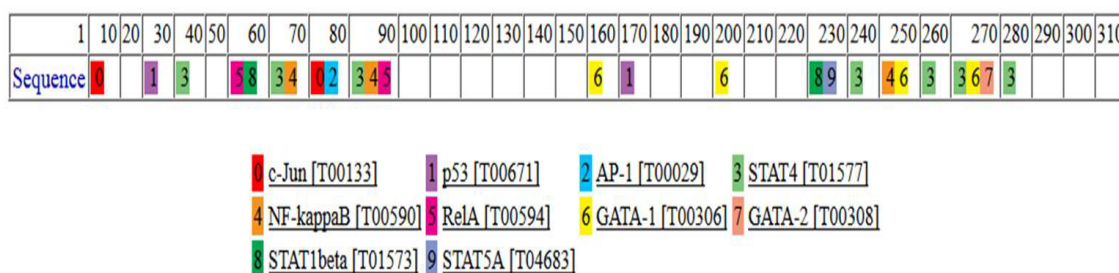


Abbildung 19: Analyse des Ox40L-Promoters auf mögliche Bindungsstellen im Bereich 300 bp *upstream* des Transkriptionsstartpunkts Unter Verwendung der Software PROMO (bereitgestellt von ALLGEN (Algorithmics and Genetics Group der Technischen Universität Katalonien, Spanien, <http://alggen.lsi.upc.es/>) zur Analyse von potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren auf Promotoren wurde der Ox40L-Promoter im Bereich 300 bp *upstream* des Transkriptionsstartpunkt untersucht. Vorausgewählt wurden hauptsächlich Faktoren, welche im JAK/STAT-, MAP-Kinase und im NF κ B-Signalweg involviert sind. Dargestellt ist schematisch die untersuchte Sequenz, die verschiedenen identifizierten Transkriptionsfaktoren und deren Position auf der Promoter. Weitere vorausgewählte Transkriptionsfaktoren, für die keine entsprechende Bindungsstellen auf dem Promoter identifiziert wurden, sind nicht dargestellt.

Im Bereich zwischen 200 und 250 bp konnte neben einer weiteren Bindungsstelle für c-Rel eine nicht genauer definierte STAT-Bindungsstelle gefunden werden. Zusammenfassend kann für den untersuchten Bereich das Vorhandensein von STAT-Bindungsstellen bestätigt werden, gleichzeitig wurden aber auch Bindungsstellen für NF κ B, AP1 und Mitglieder der GATA-Familie identifiziert.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen sollte untersucht werden, ob der TSLP-Rezeptor neben den schon bekannten Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie auch weitere Signalmoleküle aktiviert und diese genregulatorisch aktiv sein können und damit die Ergebnisse der Promoteranalyse bestätigen. Hierzu wurde das Reporter-Gen-Konstrukt pGL3-NF κ B-luc verwendet, welches durch Bindungsstellen für NF κ B-Moleküle ein nachgeschaltetes Luciferase-Gen kontrolliert. Somit kann durch Luciferase-Expression die Aktivierung des Promoters durch Mitglieder der NF κ B-Familie quantifiziert werden (siehe Abbildung 20). Dieses Reporter-Konstrukt wurde in starvierte BaF3-TSLPR-Zellen transfiziert und mit verschiedenen Konzentrationen hTSLP (0,037 pM-33,5 nM) stimuliert, wodurch ein Anstieg der Luciferase-Aktivität bis zu einem Faktor von 126 bei 33,5 nM hTSLP im Vergleich zur unstimulierten Probe erreicht werden konnte. Mit geringerer TSLP-Konzentration verringerte sich die Aktivität dosisabhängig. Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis darauf, dass neben der Beteiligung von Mitgliedern der JAK/STAT-Familie auch der NF κ B-Signalweg aktiviert wird.

Vorangegangene Promoter- und Reporter-Gen-Analysen zeigen widersprüchliche Erkenntnisse hinsichtlich der Transkriptionsfaktoren, welche den Ox40L-Promoter aktivieren. So weist die Sequenz des Ox40L-Promoters Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der STAT- wie auch der NF κ B-Familie auf, dies deckt sich mit den Ergebnissen aus Reporter-Genversuchen, in welchen der TSLP-Rezeptor sowohl den JAK/STAT- wie auch den NF κ B-Signalweg induziert. Die Verwendung der in ihrer JAK-bindenden Box1-Domäne mutierten Rezeptorketten (vergleiche Kapitel 3.1.2) würde hier zusätzliche Hinweise geben, über welchen der Signalwege der

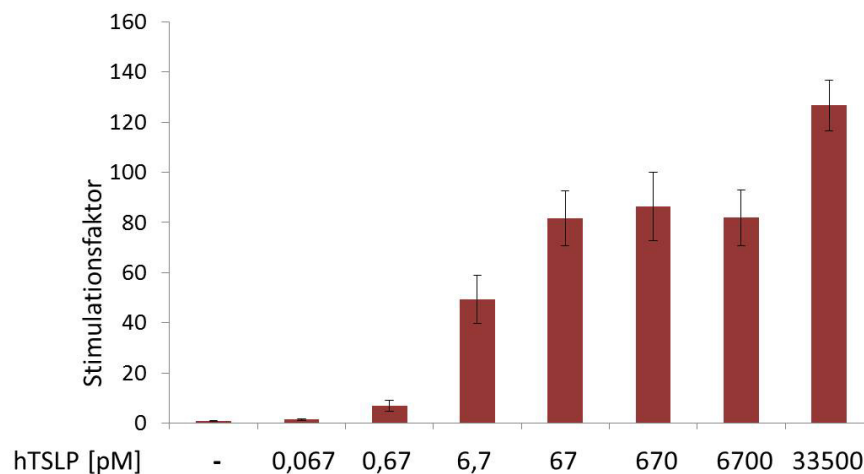


Abbildung 20: Untersuchung zur Beteiligung des $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweges an der TSLP-Rezeptor-Stimulation Zytokinstarvierte BaF3-TSLPR-Zellen wurden mit dem Reporter-Gen-Konstrukt pGL3- $\text{NF}\kappa\text{B}$ -luc transfiziert und mit verschiedenen Konzentrationen hTSLP für 12 h stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und die Luciferaseaktivität als Maß der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung luminometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Stimulationsfaktoren, berechnet aus den ermittelten relativen Lumineszenzeinheiten der stimulierten zur unbehandelten Probe. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

Promoter aktiviert wird. BaF3-Zellen wurden dazu mit den vier möglichen Varianten des TSLP-Rezeptors transfiziert: in der wildtypischen Kombination (hTSLPR α -wt + hIL-7R α -wt), jeweils einmal mit einer mutierten und einer nativen Rezeptorkette (hTSLPR α -mutBox1 + hIL-7R α -wt bzw. hTSLPR α -wt + hIL-7R α -mutBox1) und als Kombination beider mutierter Ketten (hTSLPR α -mutBox1 + hIL-7R α -mutBox1). Diese Kombinationen wurden jeweils mittels Reporter-Gen-Analyse hinsichtlich ihres Vermögens untersucht, den Ox40L-Promoter zu aktivieren. Die wildtypische Varianten des TSLP-Rezeptors induzierte unter Stimulation mit 670 pM hTSLP eine Aktivierung des Promoters um den Faktor 2 (siehe Abbildung 21). Die Variante des Rezeptors, in der beiden Ketten in ihrer Box1-Domäne mutiert wurden, war nicht in der Lage, den Promoter zu aktivieren. Für die Kombinationen, in der jeweils eine Kette mutiert wurde, ergaben sich verringerte Aktivitäten des Rezeptors (Faktor ca. 1,5). Diese Ergebnisse untermauern die Beteiligung von Janus-Kinasen an der TSLP-induzierten Ox40L-Aktivierung.

3.2.3 Inhibierung der Ox40L-Expression durch den inhibitorischen TSLPR α -Antikörper 1E10

Bei der Suche nach Möglichkeiten, die Aktivierung des TSLP-Rezeptors zu beeinflussen, konnte in der Arbeitsgruppe in Mäusen ein monoklonaler Antikörper gegen den extrazellulären Anteil der TSLPR α -Rezeptorkette generiert werden. Dazu wurde diese Rezeptordomäne löslich in HEK293-Zellen exprimiert und Mäuse zur Generierung von monoklonalen Antikörpern immunisiert. Unter den charakterisierten, bindenden Antikörpern wurden unter Verwendung der Zelllinie BAF3-TSLPR und eines STAT1-basierten Luciferase-Readout diejenigen identifiziert, welche in der Lage waren, das TSLP-induzierte Signal auf Phosphorylierungs- und

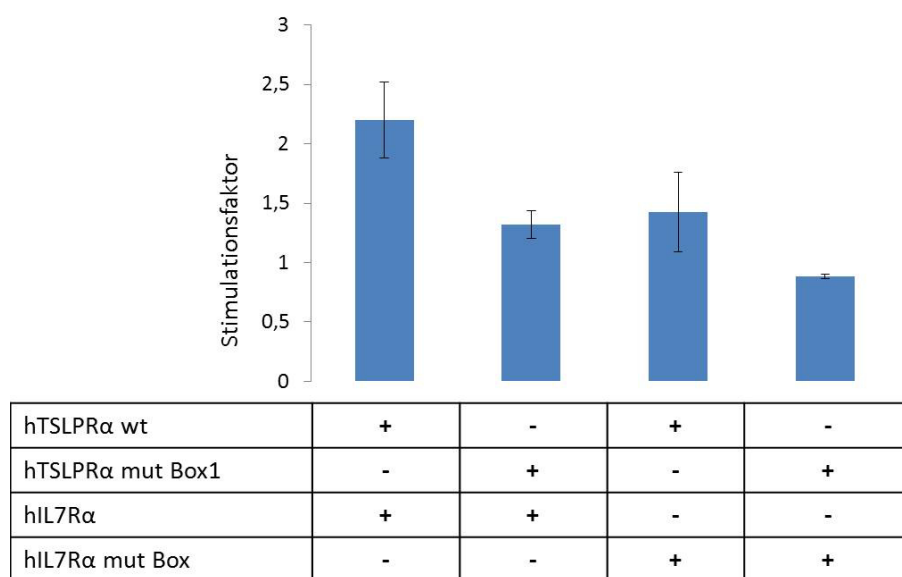


Abbildung 21: Einfluss der Mutation der JAK-bindenden Box-1-Domäne auf die Aktivierung des Promotors für den Ox40-Liganden Die dargestellten Rezeptorvarianten wurden zusammen mit dem Reporter-Gen-Konstrukten pGL4.26-Ox40L-Prom-950bp in zuvor für 6 h starvierte BaF3-Zellen transfiziert und mit 670 pM hTSLP stimuliert. Die Auswertung nach 12 h erfolgte mittels Luciferase-Assay. Dargestellt sind jeweils die Stimulationen, berechnet aus dem Verhältnis der stimulierten zur unstimulierten Probe. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

genregulatorischer Ebene zu inhibieren. Dieser inhibitorische Antikörper wurde mit 1E10 bezeichnet ([17]). Eine Regulierung des TSLP-Zielgens Ox40L durch 1E10 könnte einen therapeutischen Ansatz liefern, um die TSLP-induzierte Immunantwort zu inhibieren und sollte dazu unter Verwendung des Ox40L-Promoter-Reporter-Gen-Konstrukts analysiert werden.

Um das Potential des Antikörpers zu untersuchen, wurden BaF3-TSLPR-Zellen nach 6-stündiger Starvierung mit dem Vollängen-Reporterkonstrukt pGL4.26-Ox40LProm-950bp transfiziert und mit 670 pM hTSLP stimuliert. Zeitgleich erfolgte die Inkubation mit dem inhibitorischen Antikörper 1E10 in unterschiedlichen Konzentrationen. Der eingesetzte Konzentrationsbereich bewegt sich von 70 – 2800 nM. Um den Effekt des Antikörpers auf die Zellen selbst zu kontrollieren, wurden diese mit den gleichen Konzentrationen 1E10 inkubiert, allerdings ohne Zugabe von hTSLP. Dabei zeigt sich bei der höchsten Konzentration des Antikörpers von 2800 nM sogar eine leichte Stimulation, die aber einen Stimulationfaktor von 2 nicht überschreitet. Der TSLP-stimulierte Promoter zeigte bei der gleichen Antikörperkonzentration eine Inhibition, genauer eine Reduzierung des Stimulationsfaktors von 6 (bei 0 nM 1E10) auf ca. 2,5 (siehe Abbildung 22). Der im Vorversuch zum Vergleich eingesetzte, ebenfalls die TSLPRα-Kette bindende Antikörper VGG12 zeigte hingegen bei vergleichbarer Konzentration keine inhibierende Wirkung auf die Aktivität des Ox40L-Promoters (Daten nicht gezeigt).

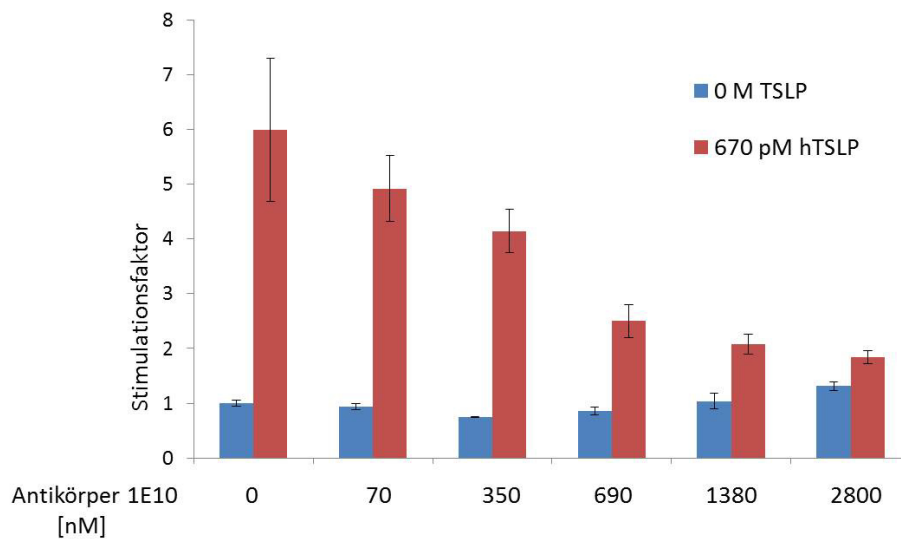


Abbildung 22: Einfluss des inhibitorischen α -TSLPR α -Antikörpers 1E10 auf die Aktivierung des Ox40L-Promoters Zytokinstarvierte BaF3-TSLPR-Zellen wurden mit dem Reportergen-Konstrukt pGL4.26-Ox40LP-950bp-luc transfiziert, mit 660 pM hTSLP stimuliert und verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers 1E10 für 12 h inkubiert (rote Balken). Um den eigenen Einfluss des Antikörpers auf die Aktivität des Promoters zu beschreiben, wurden Zellen parallel mit den gleichen Antikörpermengen inkubiert, allerdings ohne TSLP-Stimulation (blaue Balken). Die Zellen wurden lysiert und die Luciferase-Aktivität luminometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Stimulationsfaktoren, berechnet aus den ermittelten relativen Lumineszenzeinheiten der stimulierten zur unbehandelten Probe. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

3.2.4 Zusammenfassung

Das Oberflächenmolekül Ox40L ist als Targetgen der TSLP-Signalkaskade bereits bekannt, dessen Regulierung und die beteiligten Signalmoleküle allerdings nicht genau identifiziert. In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, in wie weit TSLP die Aktivierung des Ox40L reguliert. Dazu konnte unter Verwendung eines Reportergen-basierten Readout-Systems zunächst seine direkte Aktivierung durch TSLP-induzierte Signale nachgewiesen werden. Bioinformatische Analysen in der Region 300 bp stromautwärts des Transkriptionsstartpunktes, welche als hauptsächlich für die Aktivierung des Ox40L identifiziert wurde, zeigen in diesem Bereich Bindungsstellen für Mitglieder der STAT- und der NF κ B-Familien. Die Annahme, dass sowohl STATs, als auch NF κ B an der Aktivierung von Ox40L beteiligt sind, wird bestätigt durch den Nachweis von TSLP-induzierter NF κ B-Aktivierung. Mutationen der Janus-Kinase-bindenden Box1-Domäne bestätigen die Beteiligung von JAKs an der Ox40L-Aktivierung. Ein inhibitorischer Antikörper gegen die TSLPR α -Rezeptorkette reguliert ebenfalls die Transkription des Ox40L, damit konnte dessen therapeutische Relevanz bekräftigt werden.

3.3 Die TSLP-Variante W148A

Die therapeutischen Anwendungen zur Regulierung der TSLP-vermittelten Immunantwort sind bis heute beschränkt. Besonders bei fehlregulierten Signalweiterleitungen bietet die Rezeptor-Liganden-Interaktion eine wichtige Targetstruktur, um diese zu beeinflussen. Für das System des TSLP-Rezeptors könnte bereits ein inhibitorischer Antikörper generiert werden, welcher gegen die TSLPR α -Kette gerichtet ist und die Induktion eines TSLP-abhängigen Signals verringert ([17]). Weitere Ansatzpunkte wären die Verwendung inhibitorischer Antikörpern gegen den Liganden TSLP oder Moleküle, welche direkt in die Signalweiterleitung eingreifen. Ebenfalls vielversprechend ist die Generierung von Liganden-Mutanten, welche durch kompetitive Bindung des Rezeptors die Aktivierung durch den Wildtyp inhibieren ([2]). Dieser Ansatz soll im folgenden Teil der Arbeit für das Zytokin TSLP verfolgt werden.

3.3.1 Herleitung einer Hypothese zu funktionellen Substrukturen des TSLP-Moleküls

Während TSLP in seiner Funktion bereits sehr gut untersucht wurde, ist über die Struktur des Proteins außer der Primärstruktur nichts bekannt. Man geht davon aus, dass es ebenfalls zu den Zytokinen der IL-2-Familie (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-21 und TSLP) und der Familie der kurzkettigen 4-Helix-Bündel-Zytokine gehört ([79]). Die Zytokine IL-7 und IL-4 und deren dazugehörige Rezeptoren sind hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur und ihres Bindungsverhaltens schon ausführlich untersucht. So wird das Zytokin IL-7 als Protein der Klasse der alpha-Bündel-Faltung beschrieben, zusammengesetzt aus 4 alpha-Helices fast gleicher Länge und verbunden durch zwei lange und eine kurze Loop-Struktur. Daraus wird geschlussfolgert, dass die Helices A, B, C und D in einer up-up-down-down Ausrichtung verbunden sind. Dies konnte bereits vorher auch in der Kristallstruktur anderer Zytokine gesehen werden ([32]). Aus diesen Erkenntnissen und dem Wissen über die Proteinstruktur der assoziierten Rezeptorketten konnten bereits mutierte Formen dieser Zytokine identifiziert werden, welche durch veränderte Bindungseigenschaften nur noch eine reduzierte bis gar keine Aktivierung der assoziierten Rezeptoren auslösen können. Für das humane Zytokin IL-4 wurde durch den Austausch der Aminosäure Tyrosin an Position 124 durch Asparaginsäure in der D-Helix ein Antagonist gefunden, welcher den Rezeptor mit hoher Affinität binden, allerdings auf T-Zellen keine proliferative Aktivität induzieren konnte. Der Austausch der Aminosäure Tyrosin durch Histidin, Phenylalanin und Asparagin resultierte in vergleichbar starker Bindung des Liganden zu seinem Rezeptor aber nur in partiell verringerter Aktivität des Zytokins ([73]). Die Kombination zweier Mutationen in der D-Helix des IL-4 (Pos. 121 Arginin gegen Asparaginsäure und Pos. 124 Tyrosin gegen Asparaginsäure) führt zu einer funktional veränderten Variante, welche die Bindung von IL-4 und IL-13 an die gemeinsame IL-4R α -Rezeptorkette inhibiert. Diese IL-4-Variante (auch Pitracinra, AER 001 oder BAY 16-9996 genannt) befindet sich bereits in der klinischen Phase-II-Untersuchung und ruft bei Patienten mit eosinophilem Asthma eine Verbesserung der Symptome und Reduktion der Asthmaanfälle hervor ([142], [150]). Durch den Austausch der Aminosäure Tryptophan an der Position 143 durch verschiedene Aminosäuren

(Histidin, Phenylalanin, Tyrosin, Prolin oder Alanin) konnte bei dem humanen Zytokin IL-7 eine verminderte biologische Aktivität bei teilweise gleichbleibender Rezeptorbindung erreicht werden. Der Austausch durch Alanin und Prolin an gleicher Position zeigte hingegen eine reduzierte Rezeptorbindung wie auch eine reduzierte Aktivität ([32], [144]). Durch die beschriebene Entkopplung der Ligandenbindung und der Rezeptoraktivierung ist es also möglich, eine mutierte antagonistische Variante eines Liganden zu gestalten, welcher durch die Bindung an den Rezeptor kompetitiv gegenüber dem nativen Liganden wirkt, dabei allerdings keine Rezeptoraktivierung induziert. Das therapeutische Potential eines solchen Liganden läge in der Konkurrenz mit dem nativen Protein um die Rezeptorbindung und könnte damit auf übermäßig sezernierten Wachstumsfaktoren und deren erhöhte Signalweiterleitung regulierend wirken. Es liegt auf der Hand, dass eine solche Variante des TSLP ein enormes therapeutisches Potential bei der Regulierung TSLP-induzierter Immunantworten aufweist.

Um eine solche Variante für das Zytokin TSLP zu identifizieren, muss zunächst geklärt werden, ob es strukturelle Gemeinsamkeiten zu IL-4 und IL-7 gibt, auf deren Grundlage nach möglichen Mutationsstellen gesucht werden kann. Zur Bestätigung der Annahme, dass die Sekundärstruktur von TSLP den Zytokinen IL-4 und IL-7 ähnlich ist, sollte diese mit Hilfe von Struktur-Vorhersage-Programmen untersucht werden. Im Internet werden davon verschiedene angeboten, meist als frei zugängliche Software, zur Verfügung gestellt von bioinformatischen Instituten internationaler Universitäten. Zur Bestimmung der Sekundärstruktur eines Proteins auf der Basis der eingegebenen Primärstruktur (AS-Sequenz) werden verschiedene Algorithmen eingesetzt. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse von 2 unabhängigen Programmen (Freie Universität Amsterdam - YASPIN Secondary Structure Prediction - <http://www.ibi.vu.nl/programs/yaspinwww/> und Bloomsbury Centre for Bioinformatics – PSIPRED - <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) dargestellt.

Dabei wurde außer der Struktur des humanen TSLP auch die Struktur für das TSLP der Maus (murine) und des Pferdes (equine) berechnet. Als Ergebnis wurde jeder Aminosäure des Proteins eine mögliche Struktur (Helix, Coil) vorausgesagt, in der diese eingebettet ist. Zusätzlich wird über die Angabe ‚Confidence of prediction‘ (Conf) die mögliche Richtigkeit angegeben, mit der diese Aussage zutrifft. Diese Angabe ist meist bei den Helix-Strukturen sehr hoch, hier können verlässlichere Angaben gemacht werden als in den ‚Coil‘-Strukturen zwischen den Helices. Für das TSLP werden für die verschiedenen Spezies unterschiedliche Anzahlen von Helices angegeben (human – 6, murin – 5, equin – 5), wobei diese oft nur durch wenige Aminosäuren mit niedriger Richtigkeit unterbrochen werden, sodass sie vielleicht auch als zusammenhängend betrachtet werden können. Zum Vergleich zeigen die Vorhersagen für die Zytokine hIL-4 (5 Helices) und hIL-7 (6 Helices) aber auch unterschiedliche Anzahlen der Helices, obwohl als 4-Helix-Protein bereits beschrieben (Daten nicht gezeigt). Die erste Helix beschreibt dabei immer den Bereich des Signalpeptids und kann damit außer Acht gelassen werden. Da die Verteilung der Helices, sowie das Vorliegen der für die Rezeptorbindung am Beispiel von hIL-4 und hIL-7 als relevant beschriebenen c-terminalen D-Helix für die TSLP-Varianten wie auch für die bereits strukturell charakterisierten IL-4 und IL-7 vergleichbar sind, ist davon auszugehen, dass man für TSLP eine ähnliche Struktur annehmen kann. Geht man davon aus, dass TSLP auch als

humane	MFPFALLYVLSVSFRKIFILQ-LVGLVLTDFDNCDFEKIKAAAYLSTISKDLITYMSGTK
equine	M-----VFFRKIFILQ-LVGLVLTDFDNCNFAKIEEYQNVIFLALKEYMNGIK
murine	M-----VLLRSLFILQVLVRMGLTYNFSNCNFTSITKIYCNIIIFHDLTGDLKGAK
	* * :*:**** * : *::*:*:*: * . * * * * * :.* *
humane	STEFNNTVSCSNRPHCLTEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQIN
equine	STQFNHTVYCGDRPCLTEIERLTFK-SSQCLSLAKKI-VTATNATLNSHCPGHSGIQIN
murine	---FEQIEDCESKPACLLKIEYYTLNPPIPGCPSLPDKTFARRTREALNDHCPGYPETERN
	*:: * :.* ** :*: *:: . * **..: . * .:* ***.: : *
humane	-ATQAMKKRRKRKVTNNKCLEQVSQQLWRRFNRPLLKQQ
equine	-NTQAMKKRKKREVTTNKCLKQVSNLIELWRYFSR----SQ
murine	DGTQEMAQE-----VQNICLNQTSQILALWYSFMQ---SPE
	** * :. . * **:*:*.:: ** * : :

Abbildung 24: Vergleich der Aminosäuresequenz des Zytokins TSLP verschiedener Spezies

Die Aminosäuresequenz von humanem, murinem und equinem TSLP wurde mit Hilfe des frei verfügbaren Sequenz-Alignment Tools MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) verglichen. Dargestellt sind die AS-Sequenzen der 3 Proteine sowie die Übereinstimmungen (* identical / : highly similar / . similar) und Lücken (-) der Sequenzen zueinander. Rot markiert ist die hochkonservierte Region des Tryptophan (humanes TSLP Position 148, murines TSLP Position 132, equines Protein Position 136), welches für die Bindung und Aktivierung des Rezeptors von Bedeutung sein könnte.

verantwortlich ist ([32]). Diese Aminosäure wurde zunächst als Startpunkt ausgewählt, um die Auswirkung von Mutationen in dieser Domäne auf die Aktivierung des TSLP-Rezeptors zu untersuchen.

3.3.2 Konstruktion einer potentiell inaktiven TSLP-Variante, Expression und funktionelle Analyse im Kontext von Bakteriendisplay

Zur Untersuchung der Auswirkung einer Mutation an dieser Aminosäure wurde zunächst das System des Bakteriendisplays verwendet. Hierbei wird das Zytokin TSLP als Fusionsprotein mit dem membranständigen bakteriellen Protein Intimin auf die Oberfläche der Bakterien exprimiert und in dieser Form in einem Assay verwendet, mit welchem man die biologische Aktivität des wildtypischen oder des mutierten Proteins bestimmen kann (siehe Abbildung 25).

Der Vorteil dieses Ansatzes ist es, eine Bibliothek von zufälligen Mutationen des Zielproteins auf DNA-Ebene zu generieren und anschließend die verschiedenen Proteine exprimiert auf den Bakterien zum Aktivitätstest einzusetzen. Durch die direkte Kopplung des veränderten Proteins an das Plasmid, welches für die Mutation codiert, kann im Anschluss durch Isolierung des Plasmides aus den Bakterien und dessen Sequenzierung die Mutation genau bestimmt werden. Einsetzbar ist dieser Ansatz aber ebenfalls, wenn die Mutationsstelle bereits bekannt ist und die Mutation z.B. durch Primerdesign definiert eingefügt wird. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die zu untersuchenden Proteine nicht rekombinant produziert und aufgereinigt werden müssen, was sich besonders zeitaufwendig gestaltet, wenn eine Vielzahl von Mutationen untersucht werden sollen. Für das Zytokin hIL-4 konnte das Bakteriendisplay bereits angewendet werden. Die bereits identifizierten antagonistischen oder partiell antagonistischen Varianten des Proteins wurden dazu als Fusionsprotein auf der Oberfläche der Bakterien exprimiert und im Reporter-Gen-Assay anschließend unter Verwendung hIL-4-sensitiver BaF3-Zellen hinsichtlich

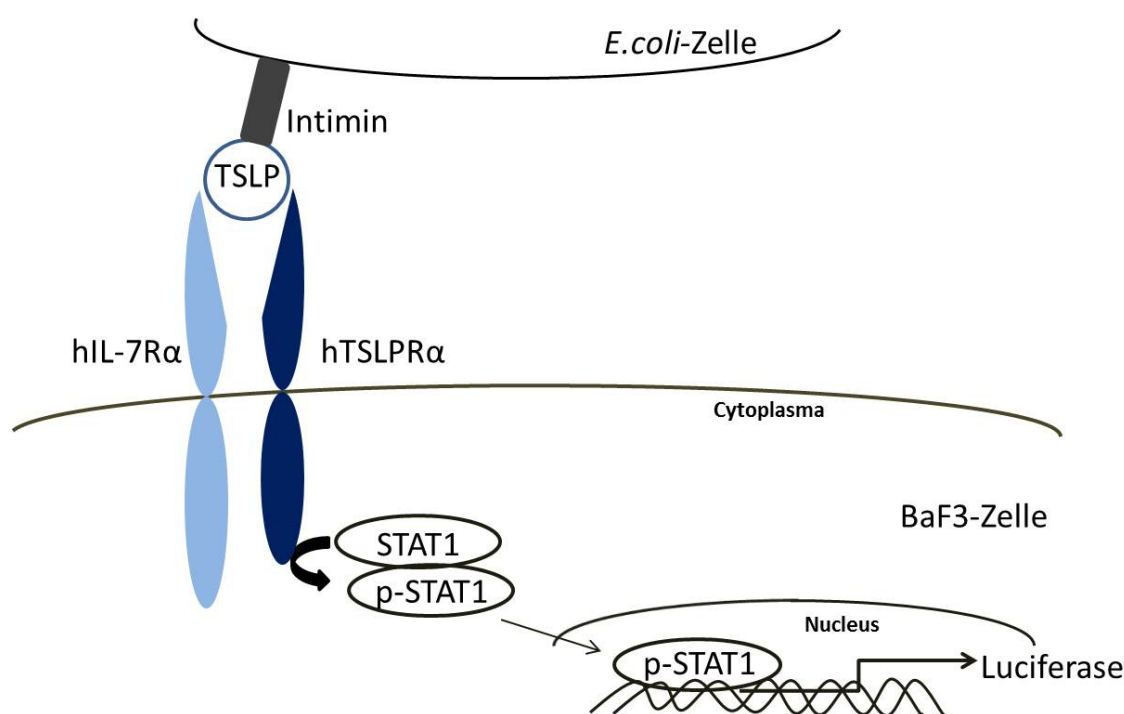


Abbildung 25: Schematische Darstellung des Bakteriendisplay am Beispiel des TSLP
E.coli-Zellen exprimieren TSLP als Fusion mit dem membranständigen Protein Intimin auf ihre Zelloberfläche. Membranständiges TSLP ist in der Lage, den TSLP-Rezeptor, exprimiert auf der Oberfläche von BaF3-TSLPR-Zellen zu aktivieren und damit eine intrazelluläre Aktivierung von STAT1 zu induzieren. Diese kann im Luciferase-Assay gemessen werden und korreliert mit der Aktivität des exprimierten TSLP.

ihres Potentials untersucht, die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT6 zu induzieren. Dabei konnte für die antagonistische Variante des hIL-4 Y124D keine transkriptionale Aktivität des STAT6 gemessen werden, die Variante hIL-4 Y124G zeigte als partieller Antagonist nur verminderte Aktivität ([70]).

Für die Anwendung dieser Methode mußte zunächst die codierende Sequenz von TSLP in das Expressionskonstrukt pASKIEP (siehe Anhang, Kapitel 6.3, XIV) kloniert werden. Unter Verwendung eines zweiten, mutierten *reverse*-Primers wurde an der Position 148 (bzw. Position 120, wenn die Sequenz des Signalpeptides nicht mit betrachtet wird) die Aminosäure Tryptophan (W) gegen Alanin (A) ausgetauscht (verwendete Primer siehe Kapitel 6.1, Seite IX). Die Klonierung der beiden TSLP-Varianten erfolgte von humaner cDNA, gewonnen aus LPS-stimulierten PBMCs. Die mutierte und native Variante wurden durch die Schnittstellen *SmaI* und *BglII* in den Vektor kloniert und anschließend durch Sequenzierung kontrolliert. Die entstandenen Konstrukte werden als pASKIEP-hTSLPwt (Wildtyp), bzw. pASKIEP-hTSLPmutW148A bezeichnet. Die Expression der Fusionsproteine erfolgt im *E.coli*-Stamm BMH 71-18 und nach Induktion mit AHT (Anhydrogentetracyclin). Nichtinduzierte Bakterien werden im Aktivitätsassay in vergleichbarer Anzahl als Kontrolle eingesetzt. Für die Untersuchung der biologischen Aktivität der TSLP-Varianten wird die TSLP-responsive Zelllinie BaF3-TSLPR verwendet und die TSLP-induzierte STAT1-Aktivierung im Reporter-gen-Assay gemessen. Will man den Einfluss

der Mutation auf diese Aktivierung bestimmen, muss man zunächst sicherstellen, dass die Expression des TSLP auf der Bakterienoberfläche für beiden Varianten (Wildtyp und mutiert) vergleichbar ist. Dazu wurde nach der Induktion die Expression des Intimin-TSLP-Komplexes mittels eines eingefügten P5D4-Tags zytometrisch nachgewiesen. Dieser wird bei Expression unter Verwendung eines α P5D4-Antikörpers gebunden und durch einen sekundären Antikörper fluoreszierend angefärbt. Aus einer größeren Anzahl induzierter wildtypischer und mutierter Bakterienkolonien wurden für den anschließenden Aktivitätsassay solche verwendet und kombiniert, welche ein gleichstarkes Fluoreszenzsignal und damit eine vergleichbare Expression des TSLP auf die Bakterienoberfläche aufwiesen. Bei der Probe der wildtypischen Variante zeigten damit 10,4 % der Bakterien eine TSLP-Expression, bei der mutierten Variante 10,0 % der Bakterien (zur Bestimmung der Angaben siehe Material und Methoden, Kapitel 2.3.11). Die Expression ist für beiden Varianten in Abbildung 26 dargestellt.

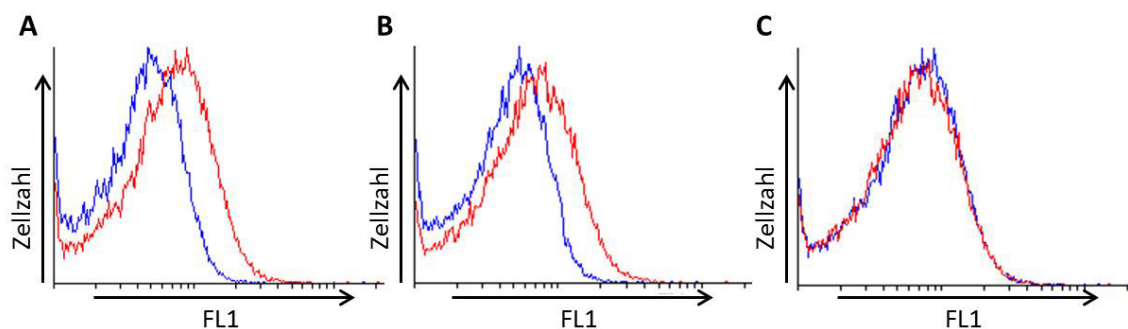


Abbildung 26: Zytometrischer Nachweis der Expression der wildtypischen und der mutierten TSLP-Variante auf der Bakterienoberfläche Uninduzierte Bakterien (A+B blaue Kurve) und induzierte Bakterien (A+B rote Kurve) wurden mit α P5D4-Antikörper für 10 min inkubiert, anschließend gewaschen und für weitere 10 min mit α -mouse-IgG-Biotin inkubiert. Der Nachweis der Bindung der Antikörper als Hinweis auf Proteinexpression erfolgte über Streptavidin-FITC. Die Detektion der Proteinexpression erfolgt im Zytometer nach Standardprotokoll in Fluoreszenzkanal 1 (FL-1). A zeigt die Expression des wildtypischen TSLP, B zeigt die Expression des TSLP W148A. C vergleicht die Expression der beiden induzierten Proben (Wildtyp – blau, Mutante – rot).

Nach Bestätigung der erfolgreichen Expression des Proteins auf die Oberfläche werden die Bakterien für den Aktivitätstest in unterschiedlicher Anzahl zu den BaF3-TSLPR-Zellen gegeben. Die Aktivität des TSLP korreliert hierbei mit der Menge an gebildeter Luciferase. Die Inkubation der Zellen mit mIL-3 als Kontrolle auf Funktion des transfizierten Reporters pGL3-IRF1-luc und hTSLP auf Responsivität der Zellen auf TSLP bewirkt eine deutliche Stimulation der STAT1-Aktivität. Die wildtypische TSLP-Variante erreichte bei einer Anzahl von $1 \cdot 10^8$ Bakterien eine Stimulation von Faktor ca. 60, wobei bei gleichen Bakterienzahl die mutierte Variante die Aktivität nur auf Faktor 5 induzieren konnte, vergleichbar mit der uninduzierten Probe. Eine Verringerung der Bakterienzahl vermindert ebenfalls das induzierte Signal. Nichtinduzierte Bakterien, welche folglich kein TSLP auf die Oberfläche exprimieren und als Kontrolle auf unspezifische Stimulation durch die Bakterien selber dienen, zeigen nur eine sehr geringe Aktivität (siehe Abbildung 27). Anhand der Daten lässt sich erkennen, dass der Austausch der Aminosäure Tryptophan (W) gegen Alanin (A) an der Position 148 des

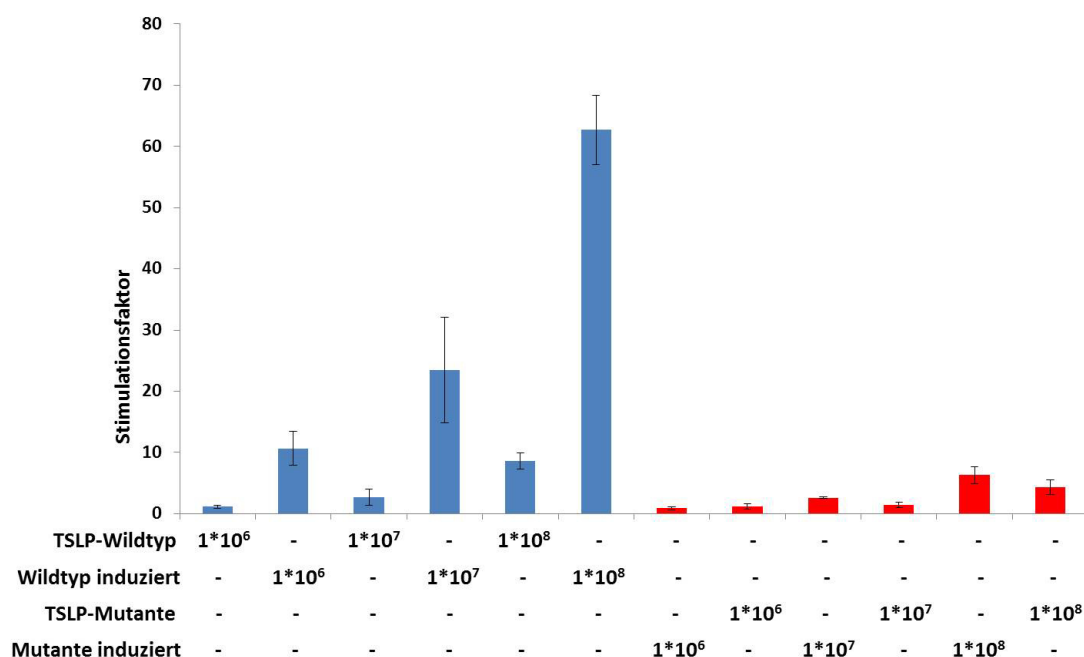


Abbildung 27: Darstellung der Aktivität der wildtypischen und der mutierten Variante des TSLP unter Verwendung des Bakteriendisplays. BaF3-TSLPR-Zellen wurden nach 6-stündiger Starvierung mit dem STAT1-responsiven Reportergen-Konstrukt pGL3-IRF1-luc transfiziert. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Anzahlen von Bakterien, welche das wildtypische TSLP (blaue Balken) oder das mutierte TSLP (rote Balken) nach Induktion (bezeichnet ‚induziert‘) exprimieren, für 6 h stimuliert. Als Kontrolle wurden die gleichen Klone uninduziert in vergleichbarer Anzahl eingesetzt. Es ist der Stimulationfaktor dargestellt, gebildet aus dem Verhältnis der relativen Lumineszenz der stimulierten zur unstimulierten Probe in Dreifachbestimmung. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

TSLP bewirkt, dass das Protein eine deutlich geringere STAT1-Aktivität auslösen kann. Um auszuschließen, dass diese verringerte Aktivität aus fehlerhafter Faltung des Proteins resultiert, wird auf Basis des zuvor beschriebenen Luciferase-Assay ein Kompetitionsassay durchgeführt. In diesem Assay wird eine gleichbleibende Menge wildtypischen TSLPs eingesetzt ($1 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^7$ und $1 \cdot 10^8$) und die zugegebene Menge an mutiertem TSLP erhöht ($1 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^7$ und $1 \cdot 10^8$). Dadurch sollte das vom wildtypischen TSLP induzierte Signal durch Erhöhung der kompetitiven, mutierten Variante verringert werden. In den Ergebnissen des Versuchs zeigt sich aber keine verringerte Aktivität, eine kompetitive Wirkung kann somit nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

3.3.3 Rekombinante Herstellung der löslichen TSLP-Variante W148A

Parallel zu dem Ansatz des Bakteriendisplays sollte auch versucht werden, das Protein in prokaryotischen Zellen rekombinant zu produzieren und aufzureinigen. Hierzu wurde die codierende Sequenz des TSLP W148A zunächst in den Expressionvektor pRSet-5b kloniert (Plasmidkarte im Anhang, siehe Kapitel 6.3, Seite XIV, verwendete Primer siehe Kapitel 6.1, Seite IX). Die Transformation des Plasmids und anschließende Expression des mutierten Proteins erfolgte in dem *E.coli*-Stamm BL21(DE3). Es schlossen sich die verschiedenen Schritte von

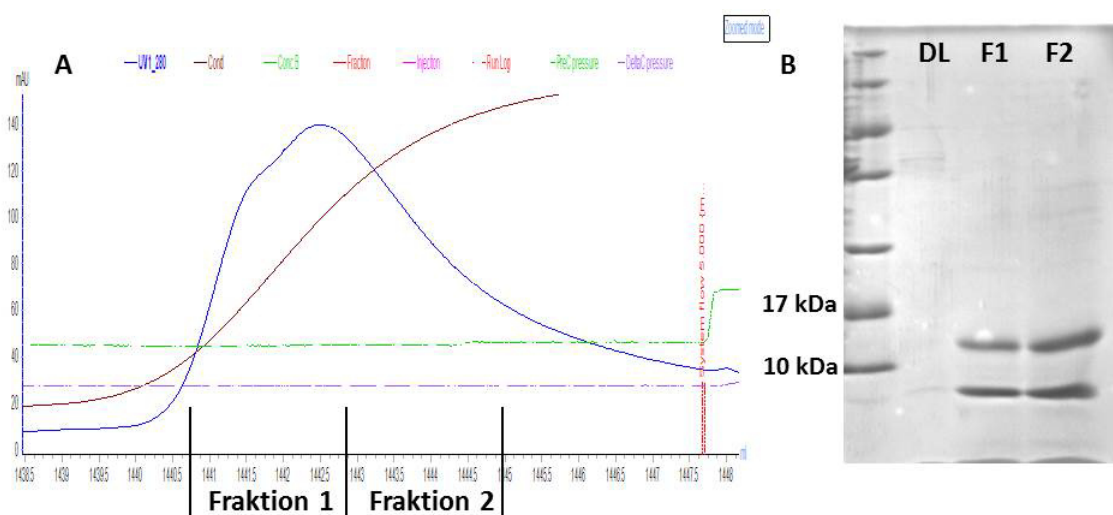


Abbildung 28: Chromatogramm und Silbergel zur Aufreinigung des Proteins TSLP W148A
Die Elution des TSLP von der CM-Sepharose-Säule ist in (A) dargestellt. Das Protein wurde in zwei Fraktionen aufgefangen und zur Kontrolle der Reinheit im Silbergel (B) analysiert. (Abkürzungen F1, F2 - Fraktion 1/2, DL - Durchlauf)

erfolgte unter Verwendung von Ionen-Austausch-Chromatographie mit einem im Vergleich zur Aufreinigung des wildtypischen TSLP (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.4.10, Seite 33) leicht abgewandelten Protokoll. Für das mutierte Protein zeigt sich eine starke Präzipitation des Proteins während der Dialyse, welche der Rückfaltung folgte. Dadurch konnte nach dem beschriebenen Protokoll nur sehr geringe Mengen an Zielprotein aufgereinigt werden. Daraufhin wurde das Protokoll dahingehend geändert, dass während der Dialyse der Salzgehalt durch Zugabe von 0,8 M NaCl stark erhöht wird, was das Ausfallen des Proteins verhindert. Anschließend wurde das Protein direkt vor dem Auftrag auf die Sepharose-Säule um den Faktor 12 verdünnt, um die Salzkonzentration der Probe zu verringern und über eine CM-Sepharose aufgereinigt (siehe Abbildung 28). Die Elution erfolgte über einen Gradienten mit steigendem Salzgehalt auf 1 M NaCl in 1 min. Nach der Dialyse des Proteins gegen PBS wurde die Konzentration bestimmt und das Protein in den folgenden Aktivitätstests auf biologische Aktivität untersucht.

Durch den Austausch des Tryptophans an der Position 148 in der D-Helix des TSLP gegen Alanin ist eine strukturelle Veränderung des Proteins möglich, welche durch veränderte Faltung in der Sekundär- und Tertiärstruktur hervorgerufen werden kann. Diese soll zunächst ausgeschlossen

werden. Hierzu wurden sieben verschiedene Antikörper gegen das wildtypische TSLP verwendet (zur Verfügung gestellt von Michael Küpper, AG Virchow, Uniklinik Rostock). Es handelt sich dabei um monoklonale Antikörper, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese sieben Antikörper verschiedene Epitope des TSLP erkennen können. Eine gravierende Veränderung der Struktur durch die Mutation soll damit erkannt werden können, wenn der Antikörper das wildtypische TSLP bindet, nicht aber das mutierte TSLP. Dafür wurden die Antikörper im Western Blot und im ELISA eingesetzt und deren Bindung an wildtypisches und mutiertes TSLP untersucht (siehe Abbildung 29). Von den sieben verwendeten Antikörpern zeigte der

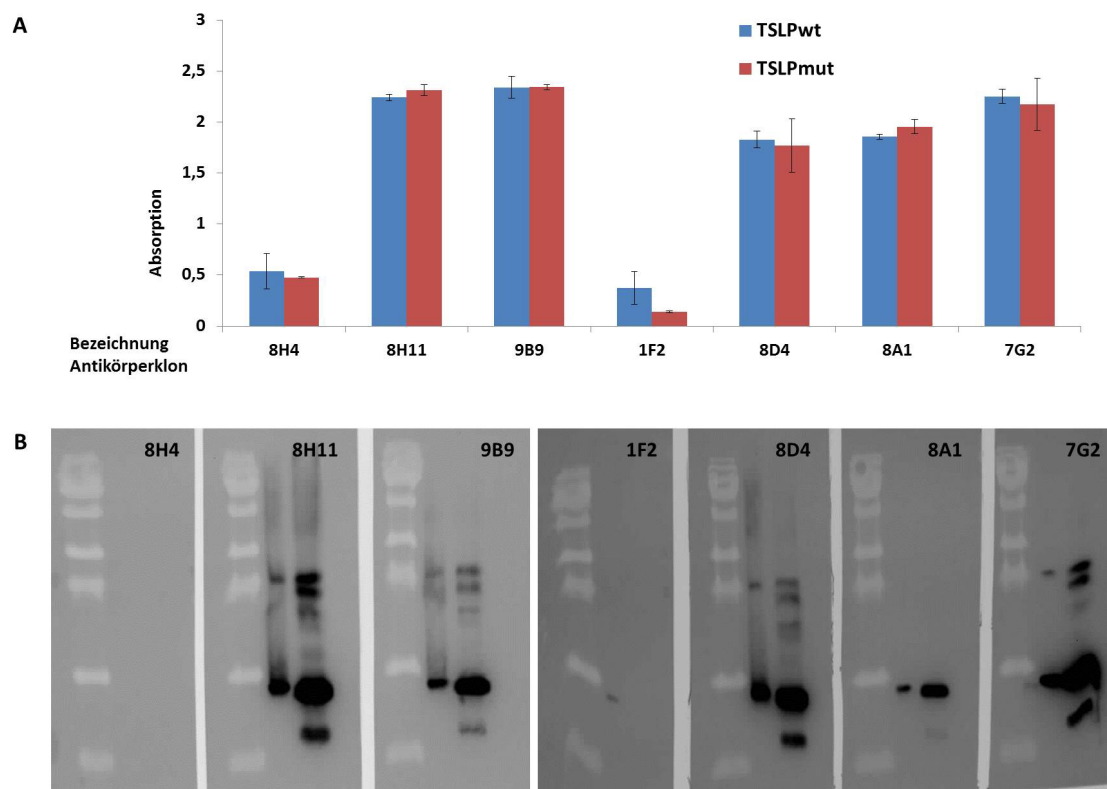


Abbildung 29: Antikörper-gestützte Untersuchungen zur strukturellen Integrität des hergestellten Proteins TSLP W148A Unter Verwendung von sieben verschiedenen Antikörpern gegen TSLP wurde im ELISA (A) und im Western Blot (B) die Faltung des hergestellten Proteins untersucht. A: TSLP-wt (blaue Balken) und TSLP-W148A (rote Balken) wurden über Nacht an ELISA-Platten gecoatet (Konzentration 1 µg/ml). Die Platten wurden für 1 h mit PBS+1 % BSA geblockt und anschließend für 1 h mit den verschiedenen αTSLP-Antikörpern als Primär-AK inkubiert (Konzentration 2 µg/ml). Die Detektion der Bindung erfolgte nach einstündiger Inkubation mit HRP-gekoppeltem goat-anti-mouse-AK (eingesetzt 1 : 3000 in PBS+BSA) durch Zugabe von TMB-Substrat. Dargestellt ist die Absorption, gemessen bei 492 nm, als Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung. B: 500 ng TSLP-wt und TSLP-W148A wurden per SDS-PAGE und Western Blot auf Nitrocellulose-Membran übertragen. Anschließend wurden die Blots mit verschiedenen Antikörpern gegen TSLP als primäre Antikörper über Nacht inkubiert (2 µg AK in 5 ml TBS-T + 0,5 % BSA). Die Bindung wurde unter Verwendung von sekundärem Antikörper goat-anti-mouse-HRP detektiert.

Klon 8H4 für beide Varianten des Proteins weder im Western Blot noch im ELISA eine Bindung an das Protein. Fünf weitere Klone (8H11, 9B9, 8D4, 8A1, 7G2) zeigten für beide Proteinvarianten vergleichbare Bindungen in beiden Methoden. Der Klon 1F2 wies nur eine Bindung des wildtypischen Proteins im Western Blot auf und kein Signal für das mutierte

TSLP. Dies wird bestätigt durch die Ergebnisse aus dem ELISA, in welchem ebenfalls nur die wildtypische Variante gebunden wurde. Dies deutet darauf hin, dass der Antikörper 1F2 spezifisch ein Epitop bindet, welches durch den Aminosäureaustausch verändert wurde. Weiteren Aufschluss über richtige Faltung und Funktionalität des Proteins gibt der Nachweis der Bindung des TSLP als Ligand an die TSLPR α -Kette. Hierzu wurde das wildtypische und das mutierte TSLP in unterschiedlichen Konzentrationen (33 – 670 nM) über Nacht an eine ELISA-Platte gecoatet und anschließend mit 60 nM löslicher extrazellulärer TSLPR α -Domäne inkubiert. Der Nachweis der Bindung an das gecoatete TSLP erfolgte über Inkubation mit einem Antikörper, welcher den n-terminalen P5D4-Tag der Rezeptordomäne erkennt (siehe Abbildung 30). Es

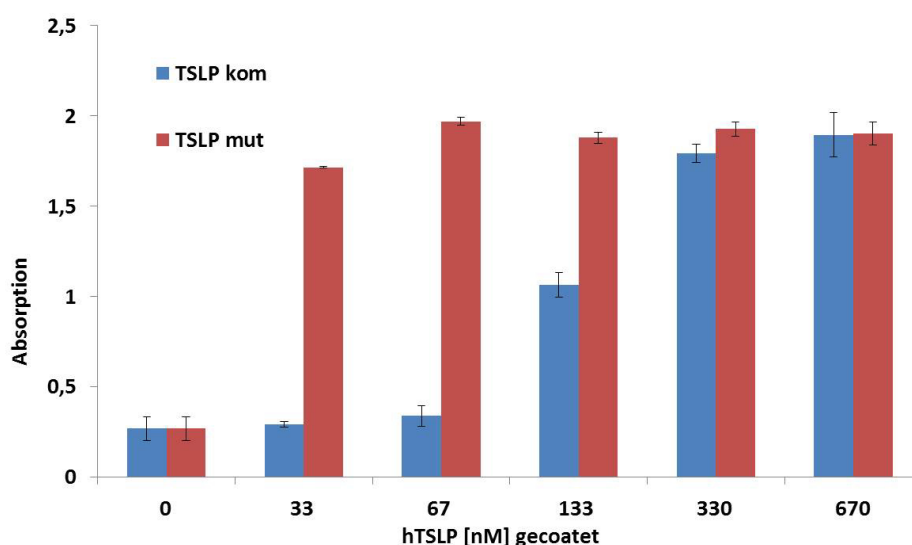


Abbildung 30: Untersuchung der Bindung von TSLP W148A an die TSLPR α -Rezeptorkette
Über Nacht wurden verschiedene Konzentrationen von wildtypischem (blaue Balken) und mutiertem TSLP (rote Balken) an ELISA-Platten gecoatet. Nach einstündigem Blocken mit PBS + 0,5 % BSA erfolgte die Inkubation mit löslichem TSLPR α -Rezeptorprotein (60 nM). Der Nachweis der Bindung des Rezeptors an das Zytokin erfolgte unter Verwendung des n-terminalen P5D4-Epitops an der löslichen TSLPR α -Domäne. Als primärer Antikörper wurde der α P5D4-Antikörper eingesetzt (Konzentration 2 μ g/ml), als sekundärer Antikörper wurde HRP-gekoppelter goat-anti-mouse-AK (eingesetzt 1:3000). Dargestellt ist die Absorption, gemessen bei 492 nm, als Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung.

konnte damit für das mutierte und das wildtypische TSLP eine Bindung an die extrazelluläre Domäne der TSLPR α -Kette gezeigt werden. Bei einer gecoateten Menge von 670 nM TSLP befindet sich für beide Varianten die gebundene Menge Rezeptor in der Sättigung. Die Daten des ELISA bestätigen zum einen, dass TSLP direkt an die TSLPR α -Kette bindet und dass die mutierte Variante die gleiche Menge Rezeptor bindet wie das wildtypische TSLP. Eine Bindung des TSLP (wt und mut) an die IL-7R α -Kette konnte im ELISA nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass das hergestellte TSLP mit der Mutation W148A eine vergleichbare Struktur und gleiches Bindungsverhalten aufweist wie die wildtypische Variante.

Das bis dahin charakterisierte mutierte TSLP sollte anschließend hinsichtlich seiner Aktivität

untersucht werden. Therapeutisch interessant wäre eine Variante des Zytokins, welche ebenfalls spezifisch den Rezeptor bindet, allerdings nicht in der Lage ist, die zweite Rezeptorkette zu rekrutieren und somit keine intrazelluläre Aktivierung auslösen kann. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte im Reporter-Gen-Assay unter Verwendung der TSLP-responsiven Zelllinie BaF3-TSLPR und einem STAT1-spezifischen Reporter-Gen-Konstrukt (siehe Abbildung 31).

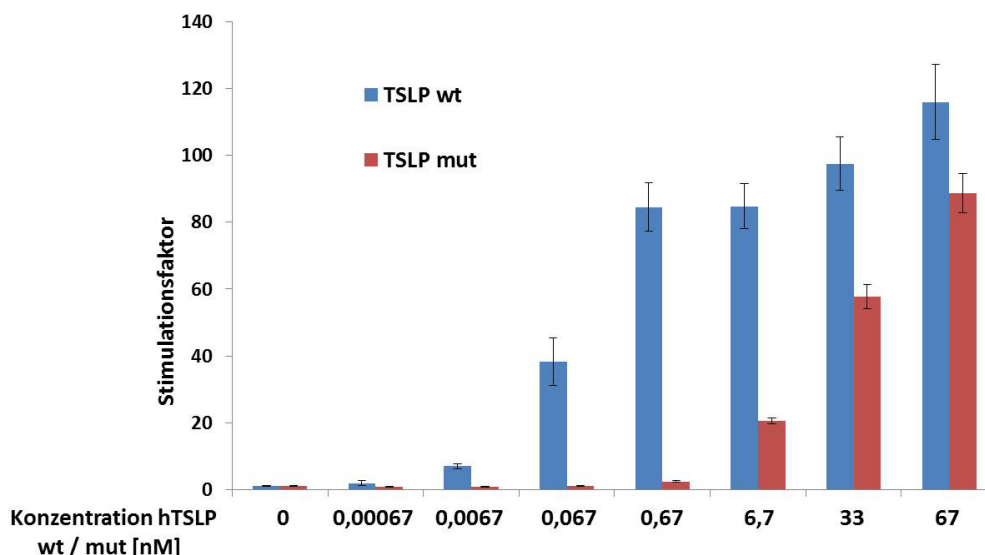


Abbildung 31: Reporter-Gen-Assay zur Bestimmung der Aktivität des TSLP W148A Starvierte BaF3-TSLPR-Zellen wurden mit dem STAT1-responsiven Reporter-Gen-Konstrukt pGL3-IRF1-luc transfiziert. Die Zellen wurden anschließend mit verschiedenen Konzentrationen wildtypischem (TSLP wt - blaue Balken) oder mutiertem TSLP (TSLP mut - rote Balken) für 12 h stimuliert. Die Auswertung erfolgt im Luciferase-Assay, dargestellt ist der Stimulationsfaktor, gebildet aus dem Verhältnis der relativen Lumineszenz der stimulierten zur unstimulierten Probe in Dreifachbestimmung. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Zellen wurden dazu für 6 h starviert und anschließend mit dem Reporter-Konstrukt pGL3-IRF1-luc transfiziert. Es folgte die Stimulation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen TSLP (wt / W148A) im Bereich von 0,67 pM bis 67 nM für 12 h. Die gebildete Luciferase wurde luminometrisch quantifiziert. Die Ergebnisse zeigen für das wildtypische TSLP einen Anstieg der Aktivität bei 0,67 pM und das Erreichen der Sättigung bei 670 pM. Die EC_{50} -Konzentration kann für das wildtypische Protein ungefähr mit 6,7 pM angegeben werden. Das mutierte TSLP zeigt eine anfängliche Aktivität ab ca. 670 pM und erreicht die Sättigung bei ca. 67 nM, daraus ergibt sich eine EC_{50} -Konzentration von ca. 33 nM. Es zeigt sich damit eindeutig die verringerte Aktivität des mutierten Proteins, somit muss eine deutlich höhere Konzentration eingesetzt werden um eine vergleichbare Aktivierung zu induzieren. Die maximale Aktivierung des mutierten TSLP liegt dabei geringfügig unter der des wildtypischen TSLP (Stimulation Wildtyp ca. Faktor 115, Mutante ca. Faktor 90).

3.3.5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, durch vergleichende Analysen mit verwandten Zytokinen nähere Informationen über die Struktur des TSLP zu erhalten. Aus diesen

Informationen konnten speziesübergreifende konservierte Aminosäuren in der D-Helix des TSLP identifiziert werden, von der eine Aminosäure Tryptophan an der Position 148 gegen Alanin ausgetauscht wurde. Unter Verwendung der Methode des Bakteriendisplay und rekombinanter Herstellung des mutierten TSLP konnte dessen Aktivität untersucht und gezeigt werden, dass die generierte Mutante eine deutlich geringere Aktivität besitzt als das wildtypische TSLP. Zusätzlich konnte die richtige Faltung des rekombinanten Proteins bestätigt werden. Ebenso ist gezeigt worden, dass das wildtypische wie auch das mutierte TSLP die TSLPR α -Kette mit gleichen Eigenschaften bindet. Allerdings löst diese Variante eine vergleichbare Aktivität des Rezeptors erst bei einer 100-fach höheren Konzentration aus.

3.4 Rezeptorhybride auf der Basis des TSLP-Rezeptors

Rezeptor-Liganden-Systeme und deren Signalwege sind in vielen medizinischen Forschungsfeldern im Fokus der Untersuchungen und therapeutisch hoch interessant, da sich hier eine Vielzahl von Möglichkeiten und Ansatzpunkten zur Beeinflussung dieser Signalkaskaden bieten. So kann extrazellulär z.B. die Bindung des Liganden an den Rezeptor durch inhibitorische Antikörper gegen Rezeptor oder Ligand sowie durch kompetitive Zytokinvarianten beeinflusst werden, lösliche Rezeptordomänen können um die Bindung der Liganden konkurrieren. Das intrazellulär aktivierte Signaling kann z.B. durch niedermolekulare Kinase-Inhibitoren ebenfalls manipuliert werden ([2]). Für die funktionale Charakterisierung solcher Moleküle wird allerdings immer ein zelluläres Modellsystem benötigt, an welchem der Einfluss auf die Signalweiterleitung untersucht werden kann. Dies gestaltet sich für manche Liganden-Rezeptor-Systeme allerdings sehr schwierig, oftmals sind benötigte Zelllinien nicht verfügbar oder schwer zu kultivieren, der Read-Out des Signalweges oder der ausgelösten Effekte kostenintensiv oder schwer zu etablieren. Die Umleitung des ausgelösten Effekts auf einen bekannten Signalweg kann hier sehr hilfreich sein.

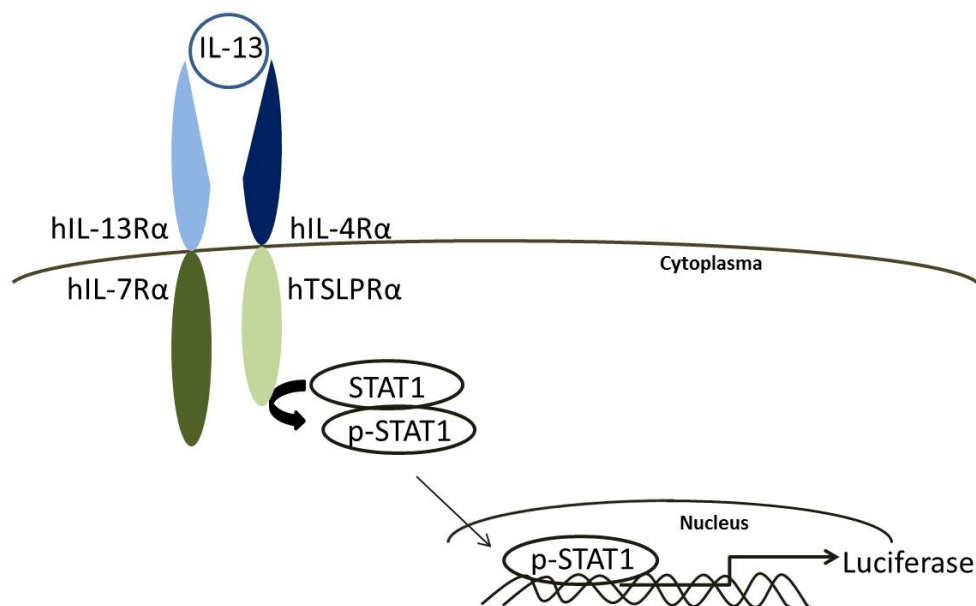


Abbildung 32: Schematische Darstellung eines Luciferase-Reportersystems auf der Basis von Hybridrezeptoren zur Bestimmung der biologischen Aktivität eines Zytokins am Beispiel von hIL-13 Die extrazellulären Domänen des humanen IL-13-Rezeptors werden an die intrazellulären signalvermittelnden Rezeptordomänen des humanen TSLP-Rezeptors fusioniert und auf der murinen Ziellinie BaF3 exprimiert. hIL-13 bindet als Ligand spezifisch seinen Rezeptor, welcher daraufhin dimerisiert und die intrazellulären Domänen dadurch in räumliche Nähe bringt, worauf diese STAT1 über Janus-Kinasen phosphorylieren. Aktiviertes STAT1 wandert in den Zellkern und lagert sich dort an spezifische STAT-Bindungsstellen Promoters des *irf1*-Gens an. Es induziert folgend die Transkription des unter der Kontrolle des *irf1*-Promoters stehenden Gens für die *firefly*-Luciferase. Die in Abhängigkeit der Stärke des hIL-13-induzierten Signals gebildete Luciferase wird anschließend im Luciferase-Assay quantifiziert (siehe Methoden). Die folgende Oxidation von Luciferin zu Oxy-Luciferin durch das gebildete Enzym Luciferase erzeugt eine detektierbare Lumineszenz. Diese korreliert direkt mit der Aktivität des induzierenden Zytokins.

Die TSLP-induzierten Signale des humanen TSLP-Rezeptors sind bereits sehr gut untersucht und aufgeklärt. In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der TSLP-Rezeptor nach Stimulation mit TSLP die Janus-Kinasen JAK1 und JAK2 phosphoryliert und damit eine Phosphorylierung und Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5 induziert. Die genregulatorische Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren konnte bestätigt ([152]). Aus vorangegangenen Untersuchungen zur Signaltransduktion des murinen und des humanen TSLP-Rezeptors (vgl. Kapitel 3.1.3, Seite 42) ist ebenfalls bereits bekannt, dass es möglich ist, die extrazelluläre Ligandenbindung und die Rezeptordimerisierung und -aktivierung von der intrazellulären Signalweiterleitung zu entkoppeln. Hierbei konnten hIL-13-induzierte Signale auf die intrazelluläre Signalweiterleitung des humanen und murinen TSLP-Rezeptors umgeleitet werden. Folgend sollte nun untersucht werden, ob diese Erkenntnisse biotechnologisch genutzt und auf andere Rezeptoren oder gar Rezeptorfamilien übertragen werden können. Damit könnte durch den einfachen Austausch der extrazellulären Domänen das Readout-System auf ein anderes Zytokin oder Target adaptiert werden. Dies würde ein sehr leichtes Verfahren zur Etablierung neuer Bioaktivitätsassays darstellen.

Der Aufbau eines solchen Read-Out-Systems ist in Abbildung 32 am Beispiel des hIL-13R α Ex/hTSLP α Int-Hybrids dargestellt. Dieser Hybridrezeptor vereinigt die extrazellulären Domänen des humanen IL-13-Rezeptors und die intrazellulären Domänen des humanen TSLP-Rezeptors. Damit wird nach Transfektion der Rezeptorketten in BaF3-Zellen und der Bindung von hIL-13 eine Dimerisierung der Rezeptorketten induziert, welche wiederum die Phosphorylierung von JAK1/2 auslöst und neben anderen Transkriptionsfaktoren anschließend STAT1 phosphoryliert. Die transkriptionale Aktivität von STAT1 kann anschließend mit einem STAT1-responsiven Reporter-Gen-Konstrukt quantifiziert werden.

Wie vorhergehend beschrieben, bestand die Frage, ob Hybridrezeptoren auch für die Charakterisierung der biologischen Aktivität von Zytokinen eingesetzt werden können. Aus den Versuchen zum Vergleich der Signalweiterleitung des murinen und des humanen TSLP-Rezeptors ist ein Hybridrezeptor-System resultiert, welches durch seine Stimulierbarkeit mit hIL-13 und seine Signalquantifizierung über die intrazelluläre Domäne des humanen TSLP-Rezeptors ebenso als Bioaktivitätsassay für humanes IL-13 genutzt werden kann. Dies würde die Verwendung einer hIL-13-responsiven Zelllinie unnötig machen, zumal der verwendete Reporter-Gen-Assay bereits etabliert ist und gut zu quantifizierende Signale liefert. Für den Aktivitätstest wurden die Expressionskonstrukte der Hybridrezeptorketten hIL-4R α Ex/TSLP α Int und hIL-13R α Ex/hIL-7R α Int zusammen mit dem STAT3-responsiven Reporter-Gen-Konstrukt pGL3-SOCS3-Luc in BaF3-Zellen transfiziert und anschließend mit hIL-13 verschiedener Konzentrationen stimuliert (siehe Abbildung 33). Die zu testenden Proben stammten aus verschiedenen Produktionschargen der Firma Invigate GmbH, zusätzlich wurde eine kommerzielle Referenz der Firma Peprotech zum Vergleich mitgeführt. Im Vergleich der beiden Proben der Firma Invigate (LOT -2100 und -2162) zeigt sich eine leicht verringerte STAT3-Aktivität für die Probe der LOT -2162 bei gleicher Konzentration. Die EC₅₀ wurde nicht berechnet, wäre aber etwas niedriger als die der LOT -2100 und der Referenz. Referenz und LOT -2100 zeigten eine vergleichbare Aktivität und damit EC₅₀. Das

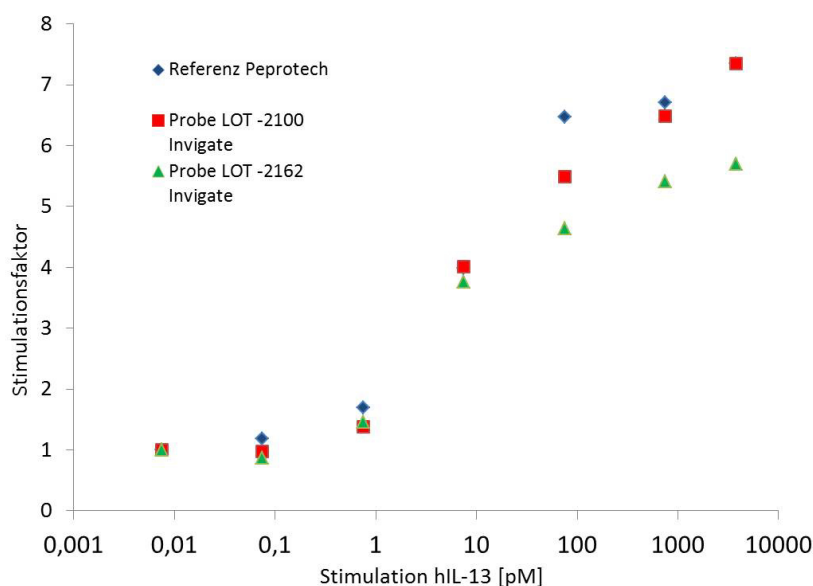


Abbildung 33: Reporter-Gen-Assay zum Vergleich der biologischen Aktivität von hIL-13 unter Verwendung der hIL-13Rex/hTSLP-Int-Rezeptorhybride Zytokin-starvierte BaF3-Zellen wurden mit dem STAT3-responsiven Reporter-Gen-Konstrukt pGL3-SOCS3-luc und den Rezeptorhybriden pcDNA3.1-hIL4RαEx/TSLPRαInt und pcDNA3.1-hIL-13RαEx/hIL7RαInt transfiziert und mit verschiedenen Konzentrationen hIL-13 stimuliert. Vergleichen wurden die Aktivitäten zweier Chargen aus der Produktion der Firma Invigate (Probe LOT -2100 (rot), Probe LOT -2162 (grün)) mit Referenzmaterial der Firma Peprotech (Referenz (blau)). Die Bestimmung der transkriptionalen Aktivität von STAT3 erfolgte mittels Luciferase-Assay. Es ist der Stimulationfaktor dargestellt, gebildet aus dem Verhältnis der relativen Lumineszenz der stimulierten zur unstimulierten Probe in Dreifachstimulation, aufgetragen gegen die eingesetzte Konzentration hIL-13. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

dargestellte Hybridrezeptor-System kann also verwendet werden, um die biologische Aktivität des rekombinanten Zytokins hIL-13 zu untersuchen.

3.4.1 Erzeugung einer stabilen Reporterzelllinie für IL-13 auf der Basis eines TSLPR-basierten Hybridrezeptors

Zunächst erfolgt die Durchführung des Bioassays immer als transients Versuch, es werden also alle benötigten Rezeptor- und Reporter-Gen-Konstrukte mittels Elektroporation zusammen in die BaF3-Zellen transfiziert. Zur besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse über mehrere Versuche hinweg wäre es hilfreich, wenn der Einfluss der Transfektionseffizienz verringert werden könnte oder gar keine Transfektion nötig wäre. Dazu müssten die Rezeptorketten stabil transfiziert sein, also permanent auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Dies soll hier mit dem gleichen Verfahren erreicht werden, wie die stabile Transfektion des humanen TSLP-Rezeptors (vergleiche Kapitel 3.1.1, Seite 35). Dazu werden die Zellen mit den entsprechenden Hybridrezeptorketten des humanen IL-13-Rezeptors (pcDNA3.1-hIL-4RαEx/hIL-7RαInt und pcDNA3.1-hIL-13RαEx/hTSLPRαInt) transfiziert. Anschließend wird das native Proliferationssignal, welches durch die Stimulation der BaF3-Zellen mit murinem IL-3 induziert wird, vollständig ersetzt durch die Zugabe von hIL-13.

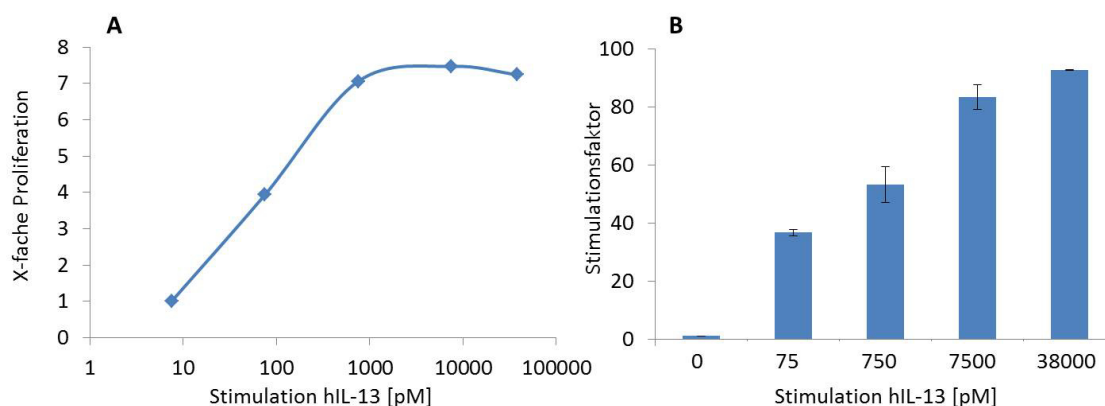


Abbildung 34: Charakterisierung der stabilen Linie BaF3-hIL-13Rex/hTSLPPrint bezüglich ihrer hIL-13-Responsivität Nach 4-wöchiger, unter Selektionsdruck mit hIL-13 erfolgter Kultivierung der mit den Rezeptorkonstrukten pcDNA3.1-hIL-4R α Ex/hIL-7R α Int und pcDNA3.1-hIL-13R α Ex/hTSLPR α Int transfizierten BaF3-Zellen wurde die Responsivität eines Klons auf hIL-13 mittels Proliferationsassay (A) und Reportergergen-Assay (B) bestimmt. Für den Proliferationsassay wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen hIL-13 stimuliert und für 48 h kultiviert. Die Auswertung erfolgte mit dem Substrat CellTiter-Glow (Promega GmbH) nach Protokoll des Herstellers. Dargestellt ist die x-fache Proliferation gezogen auf die Proliferation der unstimulierten Probe. Für den Luciferase-Assay wurden die Zellen mit einem STAT1-spezifischen Reportergergenkonstrukt transfiziert und mit verschiedenen Konzentrationen hIL-13 stimuliert. Die Auswertung erfolgte im Luciferase-Assay nach Standardprotokoll. Dargestellt ist der Stimulationsfaktor, gebildet aus der relativen Lumineszenz der stimulierten zur unstimulierten Probe in Dreifachbestimmung, in Abhängigkeit von der eingesetzten Zytokin-Konzentration. In beiden Abbildungen wurde ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen gezeigt.

Damit wird ein Selektionsdruck geschaffen, denn nur diese Zellen können weiter kultiviert werden, welche den Rezeptor für hIL-13 exprimieren und durch intrazelluläres Signaling in der Lage sind, ein proliferatives Signal zu erzeugen. Die anderen Zellen würden in Ermangelung eines Proliferationssignals nicht überleben. Zur Generierung einer stabilen BaF3-hIL-13ex/TSLPPrint-Zelllinie wurden die Zellen mit den Rezeptor-Konstrukten transfiziert und anschließend für 4 Wochen unter Zugabe von 3,8 nM hIL-13 kultiviert.

Verschiedene Klone wurden dazu parallel kultiviert und anschließend mittels Proliferationsassay und Reportergergen-Assay hinsichtlich ihrer hIL-13-Responsivität untersucht (siehe Abbildung 34). Hier konnte bei einer Stimulation der Zellen mit 38 nM hIL-13 (Konzentration im Bereich der Sättigung) im Proliferationsassay nach 48 h eine bis zu 8-fache Proliferation gemessen werden. Im Reportergergen-Assay ließ sich die STAT1-Aktivität bei dieser Konzentration über 90-fach induzieren. Die Kultivierung der Zellen erfolgte weitere 4 Wochen unter Selektionsdruck, im anschließenden Proliferations- und Reportergergen-Assay konnte die hIL-13-Responsivität bestätigt werden. Die Zellen konnten nun kryo-konserviert werden und zeigten diese Responsivität auch nach dem Wieder-in-Kulturnehmen. Ein Selektionsdruck über hIL-13-Zugabe muß aber weiterhin aufrechterhalten werden. Diese generierte Zelllinie kann nun auch später für weitere produzierte Chargen humanen IL-13 als Bioaktivitätsassay eingesetzt werden.

3.4.2 Aufbau eines Bioaktivitätsassays für das Interleukin 4 der Ratte auf der Basis eines TSLPR-basierten Hybridrezeptors

Zur Untersuchung der Adaptierbarkeit des Hybridrezeptorsystems auf andere Targets muss an weiteren Beispielen untersucht werden, ob ein einfacher Austausch der extrazellulären Domänen ausreichend ist, um ein Bioaktivitätstest für ein neues Target zu etablieren. Dies sollte am Beispiel des IL-4 der Ratte (rIL-4) geklärt werden. Herkömmlich wird die Aktivität von Ratten-IL-4 über einen Proliferationsassay mit Ratten-Milzzellen bestimmt. Dies erfolgt über die Messung der IFN γ -Sekretion dieser Zellen nach IL-4-Stimulation mittels ELISA ([101]). Hierzu müssen zunächst Milzzellen der Ratte aus primärem Material gewonnen werden, welches zumeist schwer zugänglich und anschließend nur aufwendig kultivierbar ist. Ein alternativer Ansatz wäre hier aus Zeit- und Kostengründen erstrebenswert und könnte über die Verwendung des Hybridrezeptorsystems erreicht werden. Es wurden zunächst die extrazellulären Domänen des IL-4-Rezeptors der Ratte von Ratten-cDNA kloniert (verwendete Primer siehe Kapitel 6.1, Seite IX) und über die Schnittstellen *NotI* und *XhoI* in die Hybridrezeptor-Backbones pcDNA3.1-X/hTSLPR α Int und pcDNA3.1-X/hIL7R α Int (siehe Plasmidkarte im Anhang, Kapitel 6.3, XIV) eingefügt. Die entstandenen Konstrukte wurden als pcDNA3.1-rIL-4R α Ex/hTSLPR α Int, pcDNA3.1-rIL-2R γ Ex/hIL-7R α Int, pcDNA3.1-rIL-2R γ Ex/hTSLPR α Int und pcDNA3.1-rIL-4R α Ex/hIL-7R α Int bezeichnet und mittels Sequenzierung überprüft. Die Expression der Rezeptorketten auf der Zelloberfläche der BaF3-Zellen wurde zytometrisch unter Verwendung des n-terminalen P5D4-Tags und des α -P5D4-Antikörpers nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Für den Aktivitätstest wurden BaF3-Zellen zunächst starviert und anschließend mit den Expressionskonstrukten für die Rezeptorketten hIL-4R α Ex/hTSLPR α Int und hIL-2R γ Ex/hIL-7R α Int, sowie einem STAT1-responsiven Reportergen-Konstrukt transfiziert. Die genannte Rezeptorkombination wies im Vorversuch im Gegensatz zur Variante hIL-2R γ Ex/hTSLPR α Int und hIL-4R α Ex/hIL-7R α Int eine leicht stärkere Aktivierung von STAT1 auf, was zu einem besseren Signal/Rausch-Verhältnis führte (Daten nicht gezeigt). In dem Assay sollte eine Probe der Firma Invigate (C071211AB) mit einer Referenz der Firma R&D Systems verglichen werden. Hierzu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der beiden Proben stimuliert und die induzierte STAT1-Aktivität mittels Luciferase-Assay bestimmt. Die ermittelten Daten werden grafisch aufgetragen und anhand des Graphs die EC₅₀ (halbmaximaler Effekt des Zytokins, hier STAT1-Aktivierung) der Proben bestimmt. Hierbei wurde für das produzierte Protein wie auch für das Referenz-Protein eine EC₅₀ von ca. 800 pM bestimmt. Laut Herstellerangabe hat das rIL-4 der Firma R&D Systems eine EC₅₀ von 70 pM. Dies liegt deutlich unter dem bestimmten Wert. Da Referenz und Probe allerdings eine ähnliche EC₅₀ im Bioassay aufwiesen, kann dem hergestellten Protein eine vergleichbare Aktivität attestiert werden.

Als weitere Beispiele aus der Familie der Zytokinrezeptoren können noch der murine und der humane IL-7-Rezeptor angeführt werden. Hier war es möglich, durch Klonierung der extrazellulären Domänen der IL-7R α - und der IL-2R γ -Ketten und deren Einbau in die Hybridrezeptor-Konstrukte einen Reportergen-Assay zu etablieren, mit dessen Hilfe die

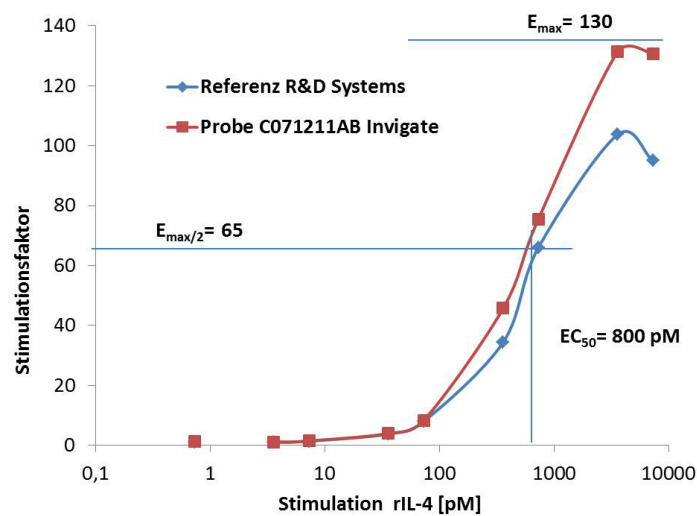


Abbildung 35: Verwendung des rIL-4Rex/hTSLP α Int-Rezeptorhybrids zur Bestimmung der EC₅₀-Konzentration von produziertem rIL-4 mit Vergleich zu kommerziell erhältlichem rIL-4. Die Rezeptorketten hIL-4R α Ex/hTSLP α Int und hIL-2R γ Ex/hIL-7R α Int wurden zusammen mit dem STAT1-responsiven Reporter-Gen-Konstrukt pGL3-IRF1-luc in zuvor für 6 h zytokinfrei kultivierte BaF3-Zellen transfiziert. Es folgte die Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen rIL-4 aus der Herstellung der Firma Invigate GmbH (Probe C071211AB) sowie der Firma R&D Systems (Referenz). Die Bestimmung der transkriptionalen Aktivität von STAT1 erfolgte mittels Luciferase-Assay nach 12 h nach Standardprotokoll. Dargestellt ist die Konzentration rIL-4, logarithmisch aufgetragen gegen den Stimulationsfaktor, berechnet aus dem Verhältnis der relativen Luciferase-Intensität der stimulierten zur unstimulierten Probe. Grafisch ermittelt wurde aus dem Graphen die EC₅₀-Konzentration des rIL-4 der Probe der Firma Invigate. Hierzu wurde der halbmaximale (E_{max/2}) Effekt (Stimulationsfaktor) aus der Kurve bestimmt und von dem Schnittpunkt auf die Abszisse gelotet. Ermittelt wurde damit die Konzentration, bei welcher der halbmaximale Effekt (hier STAT-Aktivierung) auftritt, diese gibt einen Hinweis auf die biologische Aktivität des produzierten Proteins. Der ermittelte Wert kann nun mit der EC₅₀-Konzentration der Referenz verglichen werden.

Aktivität von murinem und humanem IL-7 quantifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Weiterhin gelang es, einen funktionalen Hybridrezeptor für den murinen TSLP-Rezeptor aufzubauen, hier wurden die extrazellulären Domänen der murinen TSLP α - und der murinen IL-7R α -Rezeptorkette mit der intrazellulären Domäne des humanen TSLP-Rezeptors fusioniert.

3.4.3 Generierung und Anwendung von TSLP α -basierten Hybridrezeptoren für Liganden von Rezeptortyrosinkinasen

Die Ergebnisse aus den vorangegangenen Experimenten geben Hinweise darauf, dass es möglich ist, die intrazellulären Signale eines Rezeptors durch den Austausch von intrazellulären Domänen auf einen anderen Signalweg umzuleiten. Für die Familie der Zytokinfamilie konnte dies bereits für einige Zytokine (z.B. mTSLP, m/hIL-7, hIL-13, rIL-4) gezeigt werden. Es stellt sich nun die Frage, ob diese Variabilität auch für andere Rezeptorfamilien zutrifft. Zur Beantwortung dieser Frage soll versucht werden, ein Hybridrezeptor-System für die Familie der Rezeptortyrosinkinasen am Beispiel des humanen cFMS-Rezeptors aufzubauen. Dieser wird durch den Liganden M-CSF aktiviert. Gleichzeitig soll in diesem Ansatz untersucht werden, ob die generelle Idee, Zytokin-Rezeptor-Interaktionen durch Zugabe des löslichen Rezeptors, und

damit kompetitive Bindung des Liganden an die lösliche Domäne, zu inhibieren, auch anhand des Hybridrezeptoransatzes untersucht werden kann. Dies gäbe nicht nur Hinweise auf mögliche Inhibitoren von Rezeptor-Liganden-Interaktionen, sondern könnte auch einen Bioaktivitätstest für produzierte, lösliche Rezeptordomänen darstellen. Diese werden funktional oder auch als Antigen zur Antikörpergenerierung eingesetzt und benötigen dafür eine vorherige funktionale und strukturelle Kontrolle.

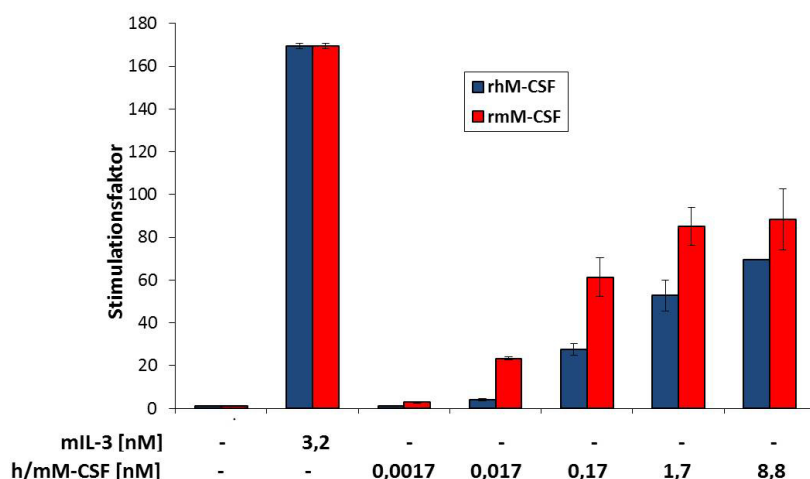


Abbildung 36: Reportergen-Assay zur Bestimmung der M-CSF-induzierten Stat1-Aktivität unter Verwendung der c-FMSEX/TSLPRint-Hybride BaF3-Zellen wurden für 6 h starviert und mit den Expressionskonstrukten pcDNA3.1-hc-FMSEX/hTSLPR α Int und pcDNA3.1-hc-FMSEX/hIL-7R α Int transient transfiziert und mit unterschiedlichen Konzentrationen humanem (blaue Balken) und murinem (rote Balken) M-CSF stimuliert. Die Bestimmung der transkriptionalen Aktivität erfolgte nach 12 h mittels Luciferase-Assay nach Standardprotokoll. Es ist der Stimulationfaktor dargestellt, gebildet aus dem Verhältnis der relativen Lumineszenz der stimulierten zur unstimulierten Probe in Dreifachbestimmung. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

Zum Aufbau eines solchen Assays wurde die extrazelluläre Domäne des homodimerisierenden humanen M-CSF-Rezeptors, genannt c-FMS, aus humaner cDNA mittels PCR kloniert (verwendete Primer siehe Kapitel 6.1, Seite IX) und das PCR-Produkt anschließend über die Restriktionsstellen *NotI* und *XhoI* in die Backbones der Hybridrezeptoren eingefügt. Die so entstandenen Fusionsproteine werden als c-FMSEX/hTSLPR α Int und c-FMSEX/hIL-7R α Int bezeichnet und mittels Sequenzierung auf die korrekte DNA-Sequenz überprüft. Die erfolgreiche Expression der Rezeptorketten auf die Zelloberfläche der BaF3-Zellen wurde 16 h nach Transfektion zytometrisch unter Verwendung des n-terminalen P5D4-Tags überprüft (Daten nicht gezeigt). Zunächst wurde die Funktionalität des generierten Rezeptorhybrids durch gemeinsame Transfektion mit einem STAT1-responsiven Reportergen-Konstrukt in BaF3-Zellen überprüft. Da der Rezeptor keine direkte Spezifität aufweist und gleichzeitig überprüft werden sollte, ob das beschriebene Rezeptorsystem sowohl als Bioaktivitätsassay für humanes, wie auch murines M-CSF genutzt werden kann, wurden diese Zellen anschließend mit verschiedenen Konzentrationen von murinem und humanem M-CSF stimuliert. Hierbei konnte in dem Konzentrationsbereich von 1,7 pM – 8,8 nM eine Aktivierung von STAT1 bis zu einem Stimulationfaktor von ca. 70 für das humane und ca. 90 für das murine M-CSF erreicht werden

(siehe Abbildung 36).

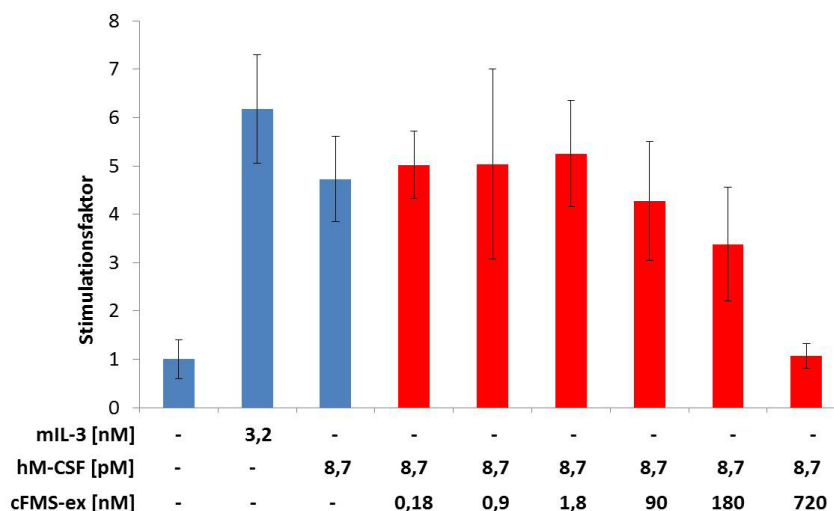


Abbildung 37: Inhibition der ligandeninduzierten STAT1-Aktivierung des Rezeptors für hM-CSF durch die lösliche Rezeptordomäne c-FMSex Zytokinstarvierte BaF3-Zellen wurden mit den Expressionskonstrukten für die Rezeptorhybride c-FMSex/hTSLPR α und c-FMSex/hIL-7R α und einem STAT1-responsiven Reportergen-Konstrukt transfiziert. Zur Transfektionskontrolle wurden die Zellen mit mIL-3 stimuliert, die Aktivierung von STAT1 erfolgte durch Stimulation der Zellen mit humanem M-CSF. Zur Inhibition des Signals wurde die lösliche extrazelluläre Domäne des humanen M-CSF-Rezeptors c-FMSex in verschiedenen Konzentrationen zugegeben (rote Balken). Die transkriptionale Aktivität von STAT1 wurde nach 12 h im Luciferase-Assay luminometrisch bestimmt. Dargestellt ist das Verhältnis der Lumineszenz der zytokinstimulierten zur unstimulierten Probe in Dreifachbestimmung als Stimulationsfaktor. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

Für die Untersuchung der Kompetition der M-CSF-induzierten Signale durch die lösliche extrazelluläre Domäne des humanen cFMS-Rezeptors wurden die Zellen mit 88 pM humanem M-CSF stimuliert und mit unterschiedlichen Konzentrationen des löslichen Rezeptors (zur Verfügung gestellt vom M. Schirmer, Fa. Invigate GmbH) inkubiert (siehe Abbildung 37). Hier zeigt sich ab der Konzentration von 1,8 nM eine Reduzierung der STAT1-Aktivität, welche bei einer Konzentration von 720 nM vollständig inhibiert wurde. Die IC₅₀, die Konzentration, bei der das Protein seine halbe inhibitorische Fähigkeit aufweist, kann mit ca. 360 nM angegeben werden.

Um die Adaptierbarkeit des Hybridrezeptorsystems zu bestätigen, wurde als zweiter Vertreter der Familie der Rezeptortyrosinkinasen der PDGFR α -Rezeptor (*platelet-derived growth factor receptor α* , in der CD-Nomenklatur auch CD140 α genannt) gewählt. PDGFs und ihre Rezeptoren, PDGFRs, spielen bereits in der pränatalen Entwicklung eine wichtige Rolle. So sind sie z. B. an der Gastrulation, der Ausbildung der Neuralleiste und an der Organbildung beteiligt, aber kaum noch im adulten System aktiv. PDGF-Rezeptoren induzieren meist ein Signal über dem MAPK-oder PI3K-Signalweg, selten auch über die Aktivierung und Phosphorylierung von STATs oder Src-Kinasen, und steuern somit verschiedene physiologische Prozesse, wie z.B. Differenzierung, Migration, Zellwachstum, gerichtete Zellbewegung, Gentranskription aber auch Inhibition von Apoptose. Der Einfluss der PDGFs und ihrer Rezeptoren auf die

genannten Zellfunktionen erklärt die große Bedeutung, welche durch ihre Fehlregulation und Überaktivierung der Entstehung von Erkrankungen wie Tumorbildung, Fibrose und Gefäßerkrankungen zukommt (Review [6]).

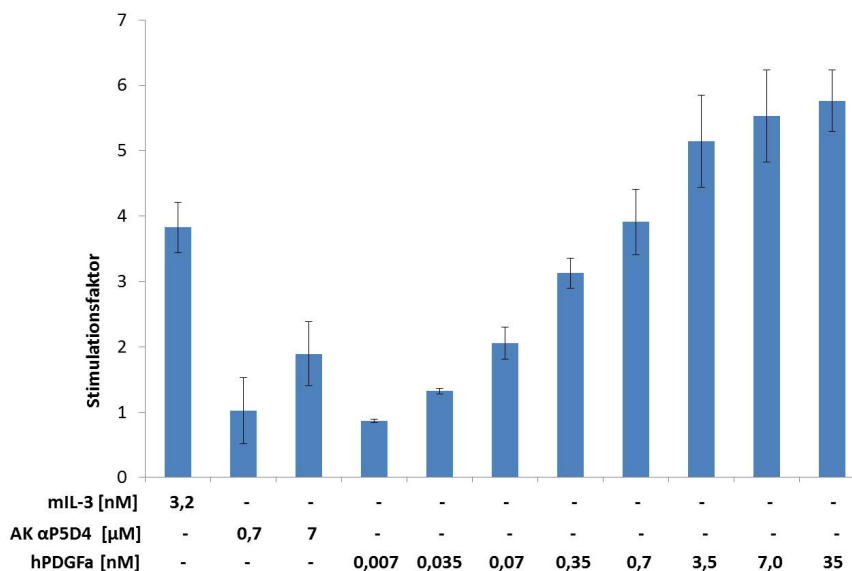


Abbildung 38: Reporter-gen-Assay zur Bestimmung der PDGFA-induzierten Stat3-Aktivität unter Verwendung von hCD140αEx/TS�PRint-Hybriden BaF3-Zellen wurden für 6 h starviert und mit den Rezeptorexpressionskonstrukten pcDNA3.1-hCD140αEx/hTS�PRαInt und pcDNA3.1-hCD140αEx/hIL-7RαInt sowie dem STAT3-spezifischen Reporter-gen-Konstrukt pGL3-SOCS3-luc transient transfiziert und mit unterschiedlichen Konzentrationen humanem PDGFA stimuliert. Zur Überprüfung der zytokinunabhängigen Stimulation wurden die Zellen mit dem P5D4-Tag-bindenden Antikörper αP5D4 inkubiert. Die Stimulation mit mIL-3 dient als Kontrolle für die erfolgreiche Transfektion des Reporter-genkonstrukts. Die Bestimmung der transkriptionalen Aktivität erfolgte nach 12 h mittels Luciferase-Assay nach Standardprotokoll. Es ist der Stimulationsfaktor dargestellt, gebildet aus dem Verhältnis der relativen Lumineszenz der stimulierten zur unstimulierten Probe in Dreifachbestimmung. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

Bei dem PDGFRα-Rezeptor (auch CD140α genannt) handelt es sich wie bei vielen Vertretern dieser Rezeptorfamilie ebenfalls um ein Homodimer, sodass für einen funktionalen Hybridrezeptor nur zwei Fusionsproteine generiert werden mussten, CD140αEx/hTS�PRαInt und CD140αEx/hIL-7RαInt. Die dazu verwendeten Primer sind in Kapitel 6.1, Seite IX zu finden. Beide Rezeptorketten wurden in BaF3-Zellen transfiziert und zeigen nach PDGFA-Stimulation eine Aktivierung von STAT3, welche mittels Luciferase-Assay bestimmt werden kann (siehe Abbildung 38). Untersucht wurde in diesem Ansatz ebenfalls die Möglichkeit, die Rezeptoren ligandenunabhängig zu stimulieren. Hierzu wurden die Zellen anstelle von PDGFA mit dem Antikörper αP5D4 inkubiert. Dieser Antikörper bindet den auf den Hybridrezeptoren n-terminal fusionierten P5D4-Tag. Anhand der Daten lässt sich erkennen, dass die Zugabe des Antikörpers eine Dimerisierung der Rezeptorketten bewirkt, wodurch die Aktivität von STAT3 verdoppelt werden kann. Ein Kontrollantikörper war nicht in der Lage, die Rezeptorketten ligandenunabhängig zu dimersieren (Daten nicht gezeigt). Dieser Versuch zeigt die einfache Adaptierbarkeit des Hybridrezeptorsystems zum Aufbau eines neuen Bioaktivitätstests für humanes PDGFA ausschließlich durch die Klonierung der extrazellulären Domäne des PDGFRα

und Ligation in die Expressionskonstrukte. Auf dieser Basis konnte für die Rezeptorfamilie der Tyrosininasen noch ein weiterer Rezeptorhybrid als Fusion von extrazellulärer Domäne des humanen EGF-Rezeptors und der intrazellulären Domäne des humanen TSLP-Rezeptors generiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.4.4 Generierung und Anwendung von TSLPR-basierten Hybridrezeptoren für Liganden von Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren

In dem vorangegangenen Teil der Arbeit konnte bereits dargestellt werden, wie die intrazelluläre Signalweiterleitung des TSLP-Rezeptors angewendet werden konnte, um verschiedene Bioaktivitätstest für Zytokine und lösliche Rezeptor-Domänen zu etablieren. Eine weitere Anwendung des Rezeptor-Hybridsystems liegt in der Suche und Charakterisierung von funktionalen und inhibitorischen Antikörpern gegen Rezeptorketten. Als Beispiel soll die Suche nach einem funktionalen Antikörper gegen die $TGF\beta$ RII-Rezeptorkette aufgeführt werden. Dieser Antikörper sollte gegen die $TGF\beta$ -Rezeptor-spezifische Kette ($TGF\beta$ RII) gerichtet sein, diese binden können und gleichzeitig die Bindung eines Zytokins an den Rezeptor, und damit dessen Aktivierung verhindern. Am Beispiel eines Antikörpers gegen die TSLPR α -Kette des humanen TSLP-Rezeptors konnte dies schon beschrieben werden. Der Antikörper bindet spezifisch diese Rezeptorkette und inhibiert damit in TSLP-responsiven BaF3-Zellen die Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5 sowie deren Proliferation ([17]). Für die Charakterisierung eines funktionalen Antikörpers gegen die humane $TGF\beta$ RII-Ketten des Rezeptors für $TGF\beta$ 1/2/3 wird ebenfalls ein Read-Out-System benötigt, mit welchem man den Einfluss des Antikörpers auf das induzierte Signaling untersuchen kann. Hierzu sollte ein weiterer Rezeptorhybrid generiert werden, welcher durch die Bindung von $TGF\beta$ extrazellulär aktiviert wird und das Signal über die intrazellulären Domänen des TSLP-Rezeptors weiterleitet. Dieses kann anschließend durch einen STAT1-spezifischen Reporter im Luciferase-Assay quantifiziert werden.

Auch wenn die Übertragbarkeit des Systems auf die bisher beschriebenen Beispiele der Rezeptoren der Zytokin- und Tyrosinkinasefamilie gezeigt werden konnte, ist dies für den $TGF\beta$ -Rezeptor als Vertreter der Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren nicht voraus zu setzen. Der Rezeptor für Mitglieder der $TGF\beta$ -Familie ($TGF\beta$ -1,2,3) besteht aus der $TGF\beta$ RI- (auch ALK5 genannt) und der $TGF\beta$ RII-Rezeptorkette. Diese bilden nach Bindung des als Dimers vorliegenden $TGF\beta$ s an die $TGF\beta$ RII-Kette ein Tetramer, bestehend aus zwei heterodimeren $TGF\beta$ RI/ $TGF\beta$ RII-Komplexen. Dabei werden die Serin- und Threonin-Reste in der GS-Domäne der $TGF\beta$ RI-Kette durch $TGF\beta$ RII phosphoryliert und darüber anschließend Mitglieder der SMAD-Familie phosphoryliert und aktiviert. Diese wandern in den Zellkern und bilden dort z.B. mit Fast-1 als Bindungspartner einen genregulatorischen Komplex ([89]).

Zum Aufbau eines $TGF\beta$ -Rezeptorhybrids wurden zunächst die beiden extrazellulären Ketten des $TGF\beta$ -Rezeptors, $TGF\beta$ RII und ALK5, kloniert (verwendete Primer siehe Kapitel 6.1, Seite IX) und mit den intrazellulären Domänen des TSLP-Rezeptors fusioniert. Die so generierten Expressionskonstrukte wurden als pcDNA3.1-hALK5ex/hTSLPR α Int, pcDNA3.1-hALK5ex/hIL-7R α Int, pcDNA3.1-hTGF β RIIex/hTSLPR α Int und

pcDNA3.1-hTGF β RIIex/hIL-7R α Int bezeichnet und mittels Sequenzierung überprüft. Während die anschließende Expression der Rezeptorvarianten auf BaF3-Zellen erfolgreich war, konnte hingegen im Reportergen-Assay nur eine sehr geringe TGF β 1-, TGF β 2- und TGF β 3-induzierte STAT1-Aktivität gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Da Kontrollexperimente ebenfalls erfolgreich verliefen, liegt der Schluss nahe, dass für diesen Rezeptortyp eine Umleitung des Signaltransduktion nicht im ausreichenden, und damit quantifizierbaren Maße möglich ist.

Die Ursache hierfür könnte in der Konformation der Rezeptorhybride und in deren Orientierung zueinander liegen. Greiser et al. weisen 2002 darauf hin, dass im Besonderen die Orientierung der intrazellulären Domänen für die durch Bindung von Liganden induzierte Signalweiterleitung enorm wichtig ist. In der beschriebenen Arbeit sollte der Einfluss der Orientierung der intrazellulären Domänen zueinander auf das induzierte Signaling am Beispiel der gp130-Kette des hIL-6-Rezeptors untersucht werden. Hierzu wurden im Bereich zwischen zytoplasmatischer- und Transmembrandomäne 1-4 Aminosäuren (Alanin) eingefügt, wodurch die nachfolgenden Bereiche der Domäne um ca. 110° pro eingebauter Aminosäure gedreht werden. Während der Einbau von einer Aminosäure die Aktivierung von STAT1 und STAT3 stark reduzierte, führte der Einbau von 3 Aminosäuren zu einer verstärkten Aktivierung der STATs. Damit konnten die Autoren zeigen, dass die Orientierung der intrazellulären Domänen zueinander einen großen Einfluss auf die induzierte Aktivität hat ([47]).

Um dem Einfluss der Orientierung der signalgebenden intrazellulären Domänen nachzugehen, diese zu verändern und somit die TGF β -induzierte STAT1-Aktivität zu erhöhen, sollte ebenfalls eine Rotation der intrazellulären Bereiche herbeigeführt werden. Hierzu sollte gleichfalls eine unterschiedliche Anzahl von Aminosäuren (Alanin) eingefügt werden, jedoch wurde hierzu der Einbau in die Transmembrandomäne der Hybridrezeptoren gewählt. Für einen Einbau in die zytoplasmatische Domäne hätte in die Sequenz eine zusätzliche Restriktionsstelle eingefügt werden müssen, deren Auswirkung auf Struktur und Funktionalität des Rezeptors nicht vorhersehbar wäre. Aus diesem Grund wurden für die hTSLPR α - und die hIL-7R α -Variante der Hybride jeweils vier Primerpaare definiert (siehe Kapitel 6.1, Seite IX), wobei der *forward*-Primer nun an den Beginn der Transmembrandomäne bindet, in dem n-terminalen Bereich dieser Domäne ein bis vier Alanine eingefügt und damit eine Rotation der Transmembrandomäne um 110° pro eingebauter Aminosäure bewirkt. Der *reverse*-Primer bindet an den c-terminalen Bereich der zytoplasmatischen Domäne. Als Template wurden die Expressionskonstrukte pcDNA3.1-hTGF β RIIex/hTSLPR α Int und pcDNA3.1-hTGF β RIIex/hIL-7R α Int verwendet, die PCR-Produkte wurden sequenziell überprüft, über die Schnittstellen *XhoI* und *XbaI* in die gleichen Expressionskonstrukte eingebaut, sodass sie nun die wildtypischen Transmembranbereiche ersetzen. Der Einbau der PCR-Produkte erfolgte parallel in die Expressionskonstrukte pcDNA3.1-hALK5ex/hTSLPR α Int und pcDNA3.1-hALK5ex/hIL-7R α Int. Die Klonierung ist schematisch in Abbildung 39 dargestellt, die Übersicht aller generierter Rezeptorhybride zeigt die Abbildung 40.

Abschließend wurden alle möglichen Kombinationen, welche sich aus der Fusion der extrazellulären Domänen des TGF β -Rezeptors (TGF β RII- und ALK5-Kette) mit der

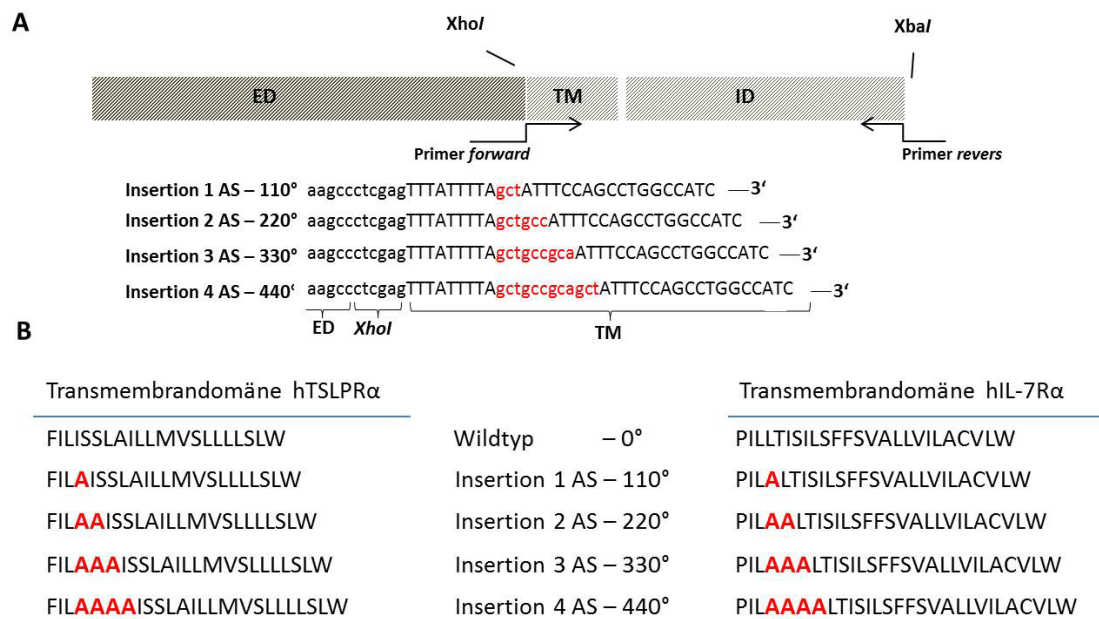


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Klonierung und Aminosäureabfolge der modifizierten Transmembrandomäne der TSLP α - und IL-7R α -Rezeptorkette (A) Der Einbau von bis zu vier Aminosäuren (AS) in den n-terminalen Bereich der Transmembrandomäne (TM) der TSLP α - und IL-7R α -Rezeptorkette (beispielhaft dargestellt TSLP α) erfolgt durch Klonierung mit modifizierten *forward*-Primern, welche nach der dritten AS der TM-Domäne die Basensequenz für bis zu vier AS (Alanin) einfügen. Der *reverse*-Primer besitzt eine komplementäre Sequenz zum c-terminalen Ende der intrazellulären Domäne (ID). Das klonierte Fragment kann nun über Restriktionsenzyme *XhoI* und *XbaI* in den Vektor pcDNA3.1 ligiert werden. **(B)** zeigt die Aminosäuresequenz der TSLP α - und IL-7R α -Rezeptorkette der unveränderten Transmembrandomäne (Wildtyp) und der modifizierten Varianten mit 1, 2, 3 oder 4 zusätzlichen Aminosäuren (Alanin). Der Einbau einer Aminosäure bewirkt eine Rotation der nachfolgenden Rezeptorstruktur um 110°, die wildtypische Variante wird damit mit 0° angegeben.

intrazellulären Domänen des TSLP-Rezeptors (TSLP α - und IL-7R α -Kette, einschließlich jeweils ein bis vier eingefügter Aminosäuren in der Transmembrandomäne) zusammen mit einem STAT1-responsiven Reporter-Konstrukt in zuvor starvierte BaF3-Zellen transfiziert und anschließend mit gleichen Konzentrationen TGF β -3 (8 nM) stimuliert. Die Bestimmung der transkriptionalen Aktivität von STAT1 in Abhängigkeit von der Orientierung der intrazellulären Domänen zueinander wurde mittels Luciferase-Assay vorgenommen (siehe Abbildung 40). Die Daten zeigen deutlich die Auswirkung der Insertion in die Transmembrandomäne. Je nach Anzahl der Aminosäuren und der daraus folgenden Rotation, sowie deren Kombination zueinander, lässt sich STAT1 unterschiedlich stark aktivieren. Die stärkste Aktivierung zeigen die Kombinationen, welche 2 Aminosäuren in die TSLP α -Kette und 2 bzw. 3 Aminosäuren in der IL-7R α -Kette eingefügt hatten. Hier konnte in diesem Experiment ein Stimulationsfaktor von ca. 5 erreicht werden. Diese Kombination (pcDNA3.1-hTGF β RIIex/TSLP α Int-2AS und pcDNA3.1-hALK5ex/IL-7R α Int-2AS) wurde nun für die weiteren Experimente zur Identifizierung von inhibitorischen Antikörpern gegen die TGF β RII-Rezeptorkette benutzt. Unter Verwendung der intrazellulären Domänen des TSLP-Rezeptors und deren Orientierungsoptimierung durch Einfügen einer Rotation in die Transmembrandomäne

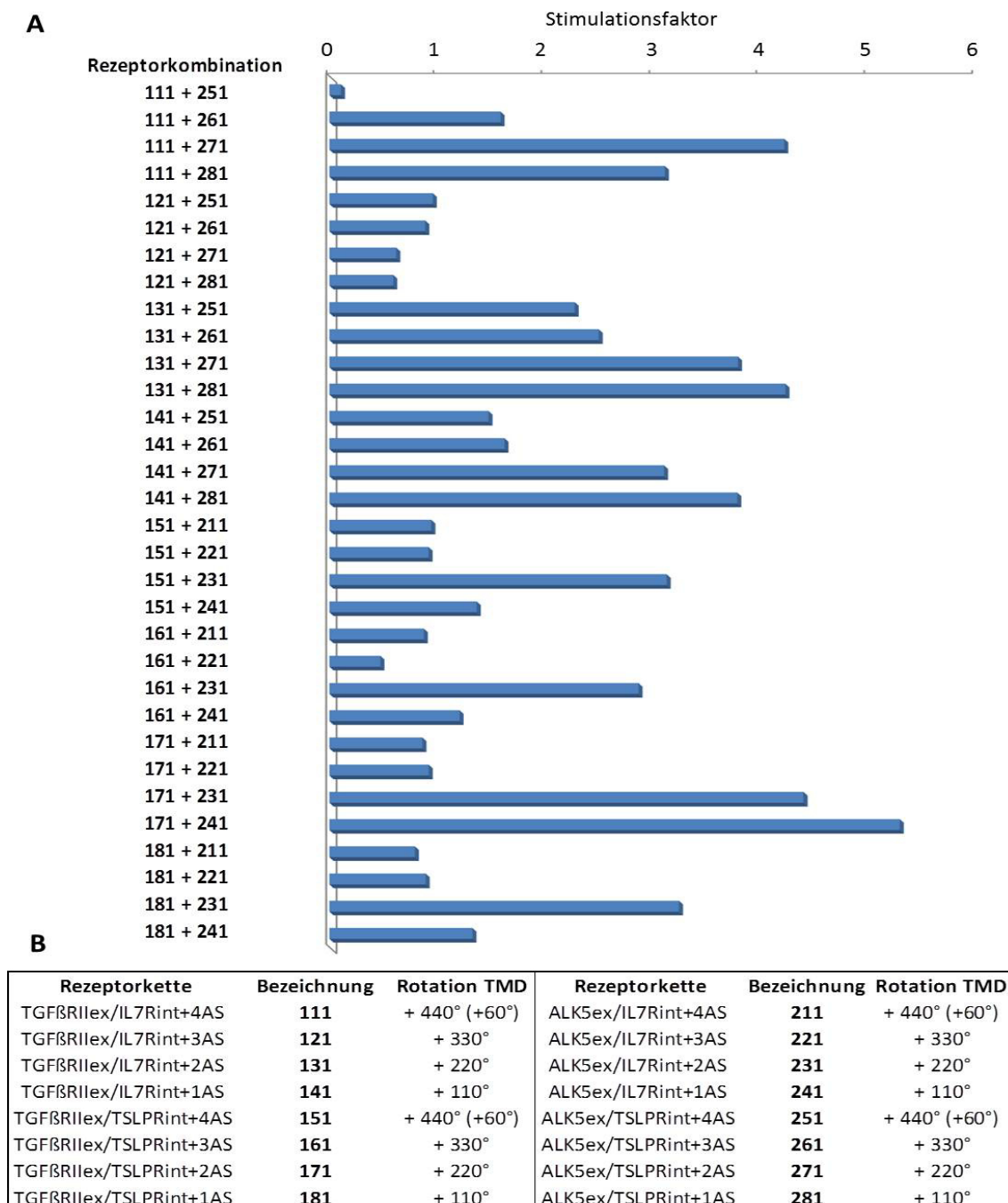


Abbildung 40: Darstellung der TGFβ-Rezeptor-vermittelten STAT1-Aktivität in Abhängigkeit von der gegenseitigen Rotation der Transmembran- (TMD) und intrazellulären Domänen. Die zur Transfektion verwendeten Rezeptorkombinationen sind links dargestellt. Die jeweilige Kombination wurde zusammen mit dem STAT1-responsiven Reportergen-Konstrukt pGL3-IRF1-luc in zytokinstarvierte BaF3-Zellen transfiziert und jeweils mit mIL-3 als Positivkontrolle (Daten nicht gezeigt) und 8 nM hTGFβ-3 zur Stimulation inkubiert. Die Auswertung der Luciferaseaktivität erfolgte nach 12 h mit Standardprotokoll. Neben der jeweiligen Rezeptorkombination ist der Stimulationsfaktor im Balkendiagramm (A) dargestellt, berechnet aus dem Verhältnis der hTGFβ-3-stimulierten zur unstimulierten Probe. Die Hybridrezeptorvarianten, die Anzahl der in die Transmembrandomäne (TMD) eingebauten Aminosäuren und die darausfolgende Rotation in Grad (°) sowie die Bezeichnung der einzelnen Ketten ist der Tabelle (B) zu entnehmen.

der IL-7R α - und der TSLPR α -Kette konnte für den TGF β -Rezeptor als Vertreter der Serin/Threonin-Kinasen ein Rezeptorhybrid generiert werden, welcher in dosisabhängiger Weise nach Stimulation mit TGF β -1 und TGF β -3 die Aktivierung von STAT1 induzieren kann (siehe Abbildung 41).

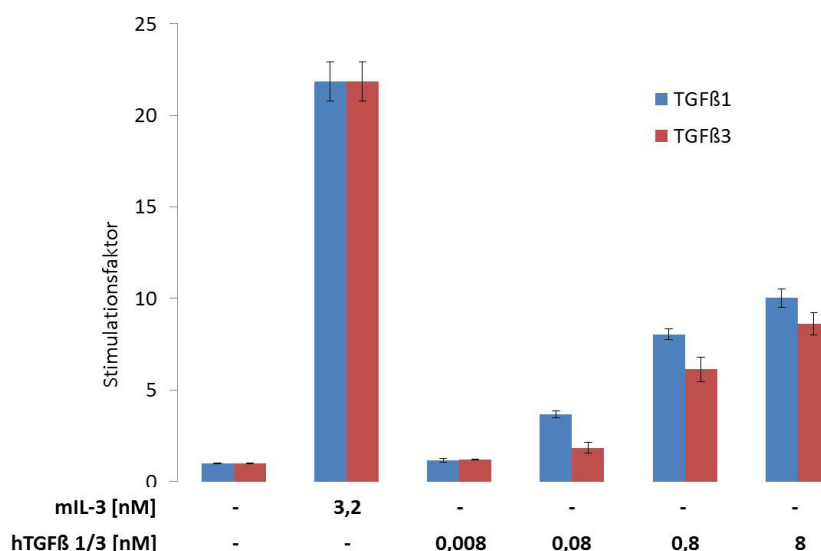


Abbildung 41: Reportergermanalyse zur Bestimmung der TGF- β -induzierten Aktivierung orientierungsoptimierter hTGF β Rex/TSLPRint-Hybride Zytokinstarvierte BaF3-Zellen wurden mit den Rezeptorexpressionskonstrukten pcDNA3.1-hTGF β RIIex/TSLPR α Int-2AS und pcDNA3.1-hALK5ex/IL-7R α Int-2AS sowie dem STAT1-spezifischen Reportergergenkonstrukt pGL3-IRF1-luc transient transfiziert und mit unterschiedlichen Konzentrationen humanem TGF β -1 (blaue Balken) und TGF β -3 (rote Balken) stimuliert. Die Stimulation mit mL-3 dient als Kontrolle für die erfolgreiche Transfektion des Reportergergen-Konstrukts. Die Bestimmung der transkriptionalen Aktivität erfolgte mittels Luciferase-Assay nach Standardprotokoll. Es ist der Stimulationsfaktor dargestellt, gebildet aus dem Verhältnis der relativen Lumineszenz der stimulierten zur unstimulierten Probe in Dreifachbestimmung. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

Dieses Rezeptorsystem soll nun verwendet werden, um einen inhibitorischen Antikörper gegen die TGF β RII-Kette des TGF β -Rezeptors zu identifizieren. Hierzu werden BaF3-Zellen mit der zuvor ermittelten Rezeptorkombination transfiziert und nach 6-stündiger Starvierung mit 8 nM TGF β -3 stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Antikörpern inkubiert, welche zuvor zytometrisch als TGF β RII-bindende Antikörper identifiziert wurden (siehe Abbildung 42).

Die Generierung der antikörperproduzierenden Einzelklone erfolgte zuvor nach Standardprotokoll zur Hybridoma-Gewinnung. Da die Konzentration der Antikörper im Überstand zu gering sind, müssen diese zuvor aufgereinigt oder konzentriert werden. Die inhibitorische Konzentration IC₅₀ liegt bei funktionalen Antikörpern meist zwischen 7 nM und 140 nM. Aus 10 ml Überstand sind ca. 10-50 μ g Antikörper zu reinigen. Eine chromatographische Aufreinigung über Protein-A-Sepharose-Säulen bei einer großen Anzahl von zu vertestenden Einzelklone wäre hierbei zu aufwendig. Dieser Versuch sollte eher als Vortest verwendet werden, um so potentielle Inhibitoren zu identifizieren, damit diese anschließend im größeren Maßstab expandiert und aufgereinigt werden können. Für den Versuch wurden zunächst 10 ml zellfreiem

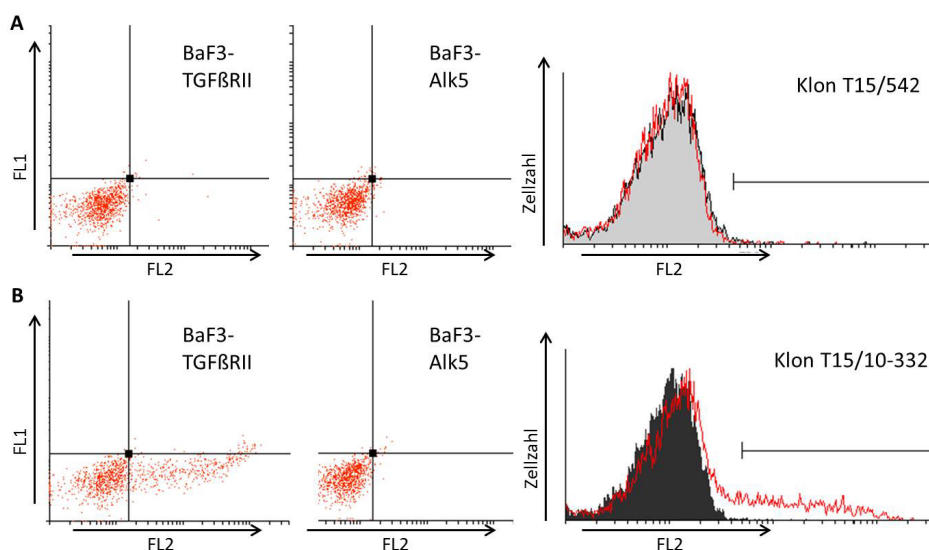


Abbildung 42: Zytometrische Charakterisierung von Antikörpern gegen die TGF β RII-Rezeptorkette Beispielfhafte Darstellung der Charakterisierung eines negativen (A) und eines positiven (B) Antikörperklons gegen die TGF β RII-Rezeptorkette. BaF3-Zellen wurden 16 h vor dem Versuch mit den Expressionskonstrukten für die nativen Rezeptorketten TGF β RII (TRII) und ALK5 transfiziert. Die Zellen wurden für 60 min mit Zellkulturüberständen der entsprechenden Antikörperklone inkubiert, anschließend gewaschen, für 30 min mit einem sekundären Antikörper (goat-anti-mouse-IgG-PE) inkubiert und im Zytometer analysiert. Die Bindung zeigt sich in einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität in Fluoreszenzkanal 2 (FL-2), aufgetragen im DotPlot gegen die unveränderte Signale in Kanal FL-1 oder im Histogramm (Graph in Abbildung rechts) aufgetragen gegen die Zellzahl. Im Histogramm zeigt die rote Kurve die Signale der BaF3-Zellen mit TRII, die ausgefüllte Fläche stellt die Kontrolle (BaF3-ALK5) dar.

Überstand jedes Einzelklons direkt mit 10 μ l Protein-A-Sepharose inkubiert. Die Elution der an die Protein-A-Sepharose gebundenen Antikörper erfolgte durch direkte Zugabe von 30 μ l 100 mM Glycin pH 2.7. Die Neutralisation des Eluats erfolgte direkt anschließend mit 5 μ l 500 mM Natriumphosphatpuffer pH 8.0. Als Negativkontrolle wurde zellfreies RFG-Medium ebenfalls mit Protein-A-Sepharose inkubiert. Überstand von α P5D4-Hybridomaklonen diente hier als Positivkontrolle, da aufgereinigte α P5D4-Antikörper in der Lage sind, die n-terminalen P5D4-Epitope der TGF β -Rezeptorketten zu dimersieren und somit eine STAT1-Aktivierung zu induzieren. Im gezeigten Versuch (siehe Abbildung 43) wurden die Überstände von 10 verschiedenen Einzelklonen aufgereinigt und die gereinigten Antikörper zu den BaF3-Zellen gegeben.

Nur für vereinzelte Klone konnte dabei eine leichte Inhibition der STAT1-Aktivität gezeigt werden (siehe Klon 10-322 und Klon A21). Die Positivkontrolle mit dem gereinigten α P5D4-Antikörper konnte die Rezeptorketten dimersieren und damit die STAT1-Aktivität deutlich erhöhen. In einer Wiederholung des Experiments inklusive Batch-Aufreinigung über Protein-A-Sepharose und des anschließenden Aktivitätstest ließ sich die inhibitorische Fähigkeit der beiden Antikörperklone allerdings nicht reproduzieren (Daten nicht gezeigt). Aus den bis dahin erzeugten Einzelklonen konnten also im Vortest keine funktionalen Antikörper identifiziert werden. Unter Verwendung des beschriebenen Read-Out-Systems können allerdings jederzeit neu

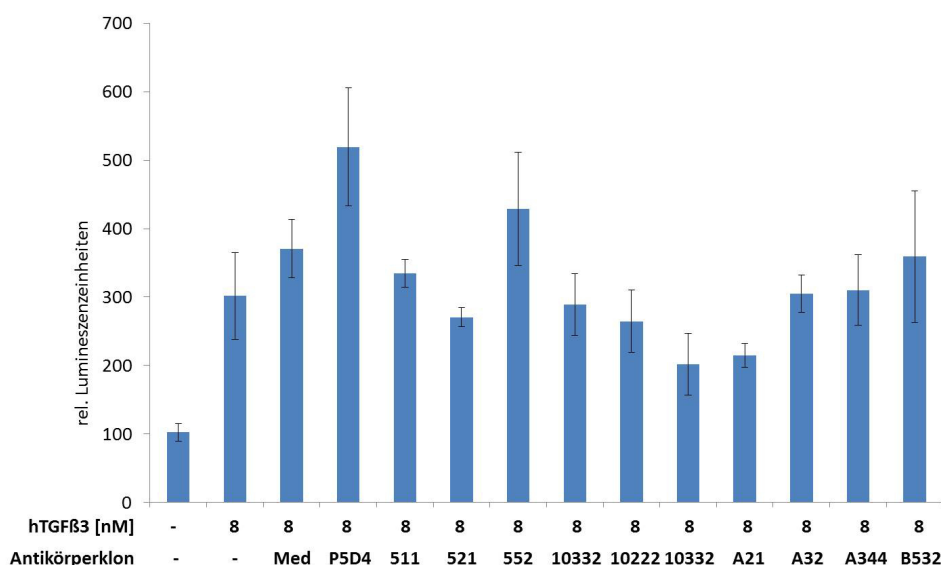


Abbildung 43: Beispielhafte Darstellung eines Reporterassays zur Bestimmung der inhibitorischen Eigenschaft von Antikörpern gegen die $\text{TGF}\beta\text{RII}$ -Rezeptorkette auf Basis der $\text{TGF}\beta\text{Rex/TSLP}\alpha\text{Int-2AS}$ -Hybridrezeptoren. Jeweils 10 ml Überstand von 10 verschiedenen Antikörper-Einzelklonen wurden mit 10 μl Protein-A-Sephrose inkubiert. Der gebundene Antikörper wurde anschließend mit 30 μl 0,1 M Glycin pH 2,7 eluiert und mit 5 μl 0,5 M Natriumphosphatpuffer pH 8,0 neutralisiert. Als Negativkontrolle wurde zellfreies Medium mitgeführt (Med.), als Positivkontrolle Überstand von einem αP5D4 -AK-produzierenden Klon. BaF3-Zellen wurden für 6 h starviert und mit den Rezeptor-Konstrukten pcDNA3.1-h $\text{TGF}\beta\text{RIIex/TSLP}\alpha\text{Int-2AS}$ und pcDNA3.1-hALK5ex/IL-7R $\alpha\text{Int-2AS}$ sowie dem STAT1-spezifischen Reporter-Konstrukt pGL3-IRF1-luc transient transfiziert. Die Zellen wurden mit 8 nM $\text{TGF}\beta 3$ stimuliert und gleichzeitig mit 10 μl der aufgereinigten Antikörperlösung inkubiert. Dargestellt ist die relative Lumineszenz in Dreifachbestimmung. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch.

generierte Klone hinsichtlich ihres Potentials auf Rezeptor-Inhibierung gescreent werden.

3.4.5 Zusammenfassung

Ausgehend von den Experimenten zum Vergleich der Signalweiterleitung des murinen und humanen TSLP-Rezeptors wurde der Ansatz des Rezeptorhybrides für verschiedene Rezeptorfamilien weiter verfolgt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten mehrere funktionelle Rezeptorhybride aus der Familie der Zytokinrezeptoren, der Rezeptortyrosinkinasen und der Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren generiert werden. Basis für alle Rezeptoren war die gut untersuchte intrazelluläre Signalweiterleitung des TSLP-Rezeptors. Dazu wurden die extrazellulären Domänen des Targetrezeptors kloniert und mit den intrazellulären Domänen des TSLP-Rezeptors fusioniert. Bei Rezeptorhybriden, welche nur ein schwaches intrazelluläres Signal induzieren, konnte dieses durch Einfügen von zusätzlichen Aminosäuren in die Transmembrandomäne und einer daraus folgenden Rotation der Transmembran- und intrazellulären Domäne deutlich erhöht werden. Insbesondere die Untersuchung des Potentials dieses variablen Rezeptorsystems hinsichtlich seiner biotechnologischen Anwendung und kommerziellen Verwertbarkeit stand in diesem Projekt im Vordergrund. Die verschiedenen generierten Hybridrezeptoren konnten dafür beispielhaft zur Aktivitätsbestimmung von Zytokinen und der Bestimmung der inhibitorischen Eigenschaften von extrazellulären Rezeptordomänen und monoklonalen Antikörpern eingesetzt werden.

4 Diskussion

4.1 Die TSLP-induzierte Signaltransduktion

Das Zytokin TSLP ist in verschiedene pathophysiologische Prozesse involviert. Es wird als Schlüsselfaktor im Bereich der allergisch-entzündlichen Reaktionen, aber inzwischen auch im Bereich einiger Krebserkrankungen diskutiert. Im Zusammenspiel mit seinem spezifischen Rezeptor TSLPR stellt es ein vielversprechendes therapeutisches Target da, dessen Beeinflussung für viele Krankheiten vorteilhaft wäre.

Zur Charakterisierung von potentiellen Therapeutika ist es nötig, die native Wirkweise des Rezeptor-Liganden-Komplexes, insbesondere dessen intrazelluläre Signalweiterleitung zu untersuchen und zu verstehen. Auf Basis dieser Erkenntnisse können zelluläre Assays aufgebaut werden, die zur Identifizierung und Charakterisierung potentieller Inhibitoren beitragen. Publierte Daten zur Signalweiterleitung des TSLP-Rezeptors weisen auf eine Beteiligung des JAK/STAT-Signalweges hin, die im vorliegenden Teil der Arbeit weiterführend untersucht werden sollte. Unter Verwendung von Western Blots und Reporterassays konnte erstmals die Phosphorylierung der Signalmoleküle JAK1 und JAK2, sowie die Phosphorylierung und transkriptionale Aktivität von STAT1 gezeigt werden ([152]). Die Phosphorylierung und Translokation der Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT5, für den humanen TSLP-Rezeptor bereits beschrieben von Reche et al., konnte in dem für diese Untersuchungen verwendeten Modellsystem BaF3-TSLPR bestätigt werden ([117]). Diese Ergebnisse werden durch Signalwegsuntersuchungen an primären TSLP-stimulierten humanen Dendritischen Zellen untermauert. Diese induzieren nicht nur die bereits bekannten Signalmoleküle, sondern phosphorylieren zusätzlich auch die Transkriptionsfaktoren STAT4 und STAT6, sowie Akt, ERK und JNK und geben damit zum ersten Mal einen Hinweis auf die Beteiligung von Signalmolekülen des MAPK-Signalwegs ([8]). Diese werden bestätigt durch Untersuchungen an HASM (*human airway smooth muscle cells*) und B-ALL-Zellen (Akute Lymphoblastische Leukämie der B-Zellen), welche ebenfalls die Phosphorylierung von ERK, p38 und JNK zeigen und teilweise für die Aktivierung von STAT3 verantwortlich sind ([129], [158]). Eine Untersuchung der transkriptionalen Aktivität dieser Moleküle steht allerdings aus. Weiterhin beschreiben Arima et al. erstmals eine Aktivierung des NF κ B-Signalweges, so werden neben den genannten Molekülen auch p50, p52, RelA und RelB als Mitglieder des NF κ B-Signalweges aktiviert. Es konnte teilweise die Translokation dieser Moleküle sowie deren Bindung an den Ox40L-Promoter beschrieben werden ([8]). Diese Erkenntnisse decken sich mit Ergebnissen aus Untersuchungen an humanen CD4⁺-T-Zellen, isoliert aus PBMCs. Diese weisen nach TSLP-Stimulation ebenfalls eine Phosphorylierung von JAK1 und JAK2, aber nicht von

JAK3 und TYK2 auf und induzieren damit STAT5-Phosphorylierung. Zusätzlich wird gezeigt, dass JAK1 dabei mit der IL-7R α -, JAK2 mit der TSLPR α -Kette assoziiert ist. Eine Beteiligung von Tec-Kinasen, wie zuvor von Isaksen et al. 2002 vermutet, konnte in T-Zellen nicht bestätigt werden ([122]). Die Befunde, dass die TSLP-induzierte Signalweiterleitung auch über Beteiligung des NF κ B-Signalwegs geht, wird außerdem gestützt von Untersuchungen an TSLP-stimulierten humanen Eosinophilen, welche keine Aktivierung von STAT3 und STAT5, dafür aber eine Aktivierung des MAPK- und des NF κ B-Signalweges beschreiben ([153]).

Auf der Basis der SILAC-Phosphoproteom-Analyse zeigen Zhong et al. 2012 eine umfassende Übersicht der TSLP-aktivierten Signalwege durch Erfassung aller Proteine, deren Phosphorylierungsstatus durch TSLP-Stimulation verändert wird. Hierzu wurden BaF3-Zellen TSLP-stimuliert und unstimuliert lysiert, mittels phosphospezifischer Antikörper Serin-, Threonin- und Tyrosinphosphorylierte Proteine isoliert und mittels Massenspektrometrie identifiziert. Sie identifizierten damit 226 Proteine, welche direkt durch TSLP in ihrer Phosphorylierung reguliert wurden, 147 Proteine wurden dabei positiv, 86 Proteine negativ reguliert. Daten aus vorangegangenen Veröffentlichungen zur Signaltransduktion des TSLP-Rezeptors konnten auf diesem Wege bestätigt werden, wie z.B. die Phosphorylierung von STAT3 und STAT5, ebenso wie JAK2, Mitgliedern des MAPK-Signalwegs (ERK1/2, JNK2, p38), allerdings nicht die Beteiligung von Molekülen des NF κ B-Signalweges oder JAK1 und STAT1. Hinweise auf Beteiligung von Signalmolekülen aus der Familie der Src- und Tec-Kinasen ([59]) werden durch diese Daten ebenfalls untermauert. Btk und Tec, Mitglieder der Tec-Kinase-Familie und scheinbar involviert in der TSLP-induzierten Aktivierung von STAT3 und Lyn, ein Mitglied der Familie der Src-Kinasen, werden ebenfalls in ihrer Phosphorylierung hochreguliert. Zusätzlich wurden auch Moleküle identifiziert, welche bis dahin noch nicht mit dem TSLP-Rezeptor in Verbindung gebracht wurden, zum Beispiel verschiedene Protein-Phosphatasen. Besonders zu nennen ist die Phosphatase SHP2, welche eine regulierende Rolle in verschiedenen Signalwegen spielt, wie z. B. im PI3-Kinase- oder NF κ B-Signalweg oder in der Ras/Erk-Kaskade ([166], [40]). Es muss aber festgehalten werden, dass bei dieser Methode BaF3-Zellen verwendet wurden, welche stabil den TSLP-Rezeptor exprimieren. Diese Daten sollten in primären Dendritischen Zellen, Mastzellen und T-Zellen bestätigt werden. Weiterhin wird hier nur der Phosphorylierungsstatus der Moleküle untersucht, es sollten zusätzlich Versuche getätigt werden, welche die transkriptionale Aktivität der Moleküle bestätigen.

Mutationen in verschiedenen Domänen des Rezeptors ermöglichen eine genauere Analyse der ausgelösten Signalprozesse und der dafür aktivierten Signalmoleküle. Zur Bestätigung der direkten Aktivierung der identifizierten STATs durch Janus-Kinasen wurden Mutationsanalysen durchgeführt, in denen die intrazellulären Box1-Domänen der TSLPR α - und der IL-7R α -Ketten so mutiert wurden, dass Janus-Kinasen nicht mehr binden können. Die Mutation der Box1-Domäne wurde in der vorliegenden Arbeit, wie bereits durch andere Gruppen beschrieben, durch ein Austausch der beiden ersten Proline gegen Serin realisiert ([143], [60]), Tanner et al. beschreiben in ihren Versuchen zur Bedeutung der Box1-Domäne für die Bindung der Janus Kinasen allerdings einen Austausch der Proline gegen Glycin ([138]). Es konnte in den Ergebnissen gezeigt werden, dass die Aktivierung der drei untersuchten Transkriptionsfaktoren

STAT1, STAT3 und STAT5 fast vollständig eliminiert werden konnte, wenn in beiden Ketten die Box1-Domänen verändert wurden. Eine mutierte TSLPR α -Kette in Kombination mit wildtypischer IL-7R α -Kette konnte ebenfalls keine Aktivierung induzieren. Eine leichte Aktivierung war noch möglich, wenn nur die IL-7R α -Kette mutiert wurde. Zum besseren Verständnis der TSLP-induzierten Signalweiterleitung haben auch andere Arbeitsgruppen den TSLP-Rezeptor verschiedenen Mutationsanalysen unterzogen. So wurde die Mutation der Box1-Domäne und des Tyrosinrests von van Bodegom et al. ebenfalls durchgeführt, zusätzlich wurde auch das Tryptophan W286 gegen R mutiert. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen eine deutlich verringerte TSLP-induzierte Proliferation von BAF3-Zellen wenn die Aminosäure Tryptophan, welche für die Dimerisierung des Rezeptores verantwortlich ist, in der TSLPR-Kette mutiert wurde (W286R), ebenso bei einer Mutation der Janus-Kinasen-bindenden Box1-Domäne. Eine Mutation des Tyrosinrests gegen Phenylalanin (Y368F) führt zu keiner verringerten Proliferation. Diese Ergebnisse können begründet werden durch fehlende Phosphorylierung von JAK1, JAK2 und STAT5 in den Zellen, welche die Box1- oder W286R-Mutation exprimieren. Die Varianten der Tyrosin-Mutation zeigt im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor keine veränderte Aktivierung dieser Faktoren. Eine Mutation der Box2-Domäne brachte keine nennenswerte Inhibition der ausgelösten Phosphorylierungen ([143]).

Hinweise zur Beteiligung des Tyrosins an Position Y368 geben auch Zhong et al. in ihren Ergebnissen. Sie zeigen ebenfalls, dass dieses Tyrosin für die Proliferation nicht benötigt wird ([167]). Dies deckt sich mit eigenen Untersuchungen, welche keine verringerte STAT-Aktivierung nach Mutation des Tyrosins gegen Phenylalanin (Y368F) beschreiben. Zhong und Pandey beschreiben zusätzlich, dass der Austausch des Tyrosins der TSLPR α -Kette keinen Einfluss auf die TSLP-induzierte Proliferation von BaF3-Zellen hat, ebenso wie die Mutation der drei Tyrosine auf der IL-7R α -Kette, einzeln oder als Kombination aller drei Tyrosine. Nur eine gleichzeitige Mutation aller Tyrosine in TSLPR α - und IL-7R α -Kette konnte die Proliferation und STAT-Aktivierung der Zellen beeinflussen ([168]). Am Beispiel des IL-6-Rezeptors wird beschrieben, wie ein intrazellulärer Tyrosinrest an der Position 759 der gp130-Rezeptorkette Einfluss auf die Signalweiterleitung des Rezeptors hat. Die durch IL-6-Stimulation ausgelöste STAT3-Aktivierung führt neben weiteren Targetgenen auch zur Transkription des Proteins SOCS3 (*Suppressor of Cytokine Signaling 3*), ein Inhibitor des STAT3-Signals, und schafft somit einen negativen Feedback-Loop. Das Protein bindet an das phosphorylierte Tyrosin 759 und inhibiert damit weitere JAK-vermittelte STAT3-Aktivierung. Gleichzeitig kann über dieses phosphorylierte Tyrosin auch das Adaptermolekül SHP2 binden, welches für die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs verantwortlich ist. Über diese kombinierte Bindung von SHP2 und SOCS3 an dieses Tyrosin kann eine Balance beider Signalwege (JAK/STAT und MAPK) reguliert werden. Eine Inhibition der Tyrosin-Phosphorylierung (z.B. durch Mutation des Tyrosins) führt damit zu einer unregulierten STAT3-Aktivierung (SOCS3 kann nicht an unphosphoryliertes Tyrosin binden) ohne gleichzeitige MAPK-Aktivierung ([40]). Dies könnte erklären, wieso eine Mutation des Tyrosins in der TSLPR α -Kette keinen Einfluss auf die STAT-Aktivierung hat. Um diese These zu bestätigen, müsste gleichzeitig die Phosphorylierung

der MAPK oder die Aktivierung von Targetgenen des MAPK-Signalweges im Zusammenhang mit der Mutation des Tyrosins 368 der TSLPR α -Kette untersucht werden.

Für den TSLP-Rezeptor konnte die Aktivierung des JAK/STAT-, des MAPK-, des NF κ B-Signalweges und von Mitgliedern der Tec- und Src-Kinasen nachgewiesen werden. Wie aus anderen Rezeptorsystemen bekannt, wirken die beteiligten Signalwege oft nicht autark, sondern beeinflussen und regulieren sich gegenseitig. Ein Beispiel für die Verbindung zwischen dem JAK/STAT-Signalweg und der Familie der Src-Kinasen zeigt sich beim IL-3-Rezeptor. Dieser phosphoryliert nach Ligandenbindung neben JAK2 auch noch Src, welches wiederum STAT3 aktiviert ([26]). In HASM-Zellen wird diese Aktivierung über die Beteiligung des MAPK-Signalwegs realisiert ([129]). Dies würde auch die TSLP-induzierte Aktivierung von STAT3 erklären, obwohl weder für die IL-7R α -Kette, die TSLPR α -Kette noch für die TSLPR-verwandte γ c-Rezeptorkette bisher eine Bindung von STAT3 gezeigt werden konnte. Für den IFN γ -Rezeptor wird beschrieben, dass dieser nach Stimulation den Transkriptionsfaktor STAT3 phosphoryliert und dieser über zeitweise Aktivierung von Akt und PI-3K eine Aktivierung von NF κ B vermittelt ([156]). Einige Publikationen beschäftigen sich mit der Wechselwirkung zwischen STATs und NF κ B-Molekülen. SOCS3, ein Regulator der STAT3-Aktivierung kann über die Regulierung von RelA, einem Mitglied der Familie des NF κ B-Signalweges ebenfalls auf diesen regulierend einwirken ([48]). Zur direkten Wechselwirkung zwischen STATs und NF κ B-Molekülen konnte in A549-Zellen über Shift-Assays herausgefunden werden, dass IFN γ -induziertes STAT1 und TNF α -induziertes p50 und p65 zunächst einen Protein-Protein-Komplex formen und in diesem Komplex anschließend DNA binden und damit Transkription regulieren können. Zusätzlich wird eine inhibitorische Eigenschaft von STAT1 auf die NF κ B-Aktivität beschrieben, welche aber eher als Zelltyp-spezifische Möglichkeit zur Regulation von Genexpression angesehen wird ([45]). Weitere Untersuchungen beschreiben Protein-Protein-Wechselwirkungen von IL-4-aktiviertem STAT6 und den NF κ B-Mitgliedern p50 und p65 ([93], [130]). Überträgt man diese Erkenntnisse auf die Signalweiterleitung des TSLP-Rezeptors, könnte angenommen werden, dass hier ebenfalls TSLP-induzierte NF κ B-Moleküle (RelA, RelB, p50, p52) durch STAT1 oder STAT6 reguliert werden oder sogar Protein-Protein-Interaktionen eingehen. Die örtliche Nähe von RelA- und STAT1-bindenden Sequenzen im Bereich 100 bp *upstream* des Ox40L-Promoters, dem wichtigsten Zielgen des TSLP-Rezeptors, weisen ebenfalls darauf hin, dass dieser Promoter von den Transkriptionsfaktoren gemeinsam im Komplex oder zumindest synergistisch aktiviert wird. Für die Untersuchung der Stat1-Aktivität wurde ausschließlich das Reporter-Konstrukt pGL3-IRF1-luc verwendet, welches zwei STAT1-Bindungsstellen der Promoterregion des IRF1-Gens mit einem Tymindekinase-Minimalpromoter kombiniert und darüber die Expression des Luciferase-Gens reguliert ([47]). Der natürliche Promoter für das *irf1*-Gen besitzt STAT1-Bindungsstellen ebenso wie κ B-Motive ([104]). Da die genauen Sequenzen der im Reporter-Konstrukt eingefügten Bindeelemente nicht beschrieben sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Regionen auch von NF κ B-Molekülen gebunden werden. Weitere Versuche zur STAT1-Aktivität sollten deshalb mit STAT1-spezifischen Reporter-Gen-Konstrukten durchgeführt werden, verfügbar wären dazu im Labor

Reporter-Konstrukte in welchen die Luciferase-Expression unter der Kontrolle von STAT1-responsiven *interferon-stimulated-response-elements* (ISRE-luc) oder *y-activated-sites* (GAS-luc), reguliert wird ([163]), für das Reporter-Konstrukt GAS-luc wird allerdings auch eine STAT5-Aktivierbarkeit gezeigt ([63]). NF κ B-Bindungsstellen sollten für alle Konstrukte vorher ausgeschlossen werden. Hierin könnte auch eine mögliche Erklärung für die Beobachtung liegen, dass der STAT1-Reporter pGL3-IRF1-luc im murinen System weniger aktiviert wird als im humanen System. Möglicherweise wird durch den murinen Rezeptor keine Aktivierung des NF κ B-Signalweges ausgelöst, sodass kein synergistischer Effekt zwischen NF κ B und STAT1 besteht. Genauer zu untersuchen wäre dies unter Verwendung von Inhibitoren (chemisch oder siRNA) gegen STAT1 und NF κ B. Einzeln und in Kombination eingesetzt ließe sich damit zeigen, wie sich die beiden Signalwege beeinflussen.

Verschiedene Zellen des Immunsystems, insbesondere Mastzellen, Dendritische Zellen und Zellen des epithelialen Gewebes der Lunge exprimieren den TSLP-Rezeptor und werden durch TSLP stimuliert. Dabei wird über unterschiedliche Signalwege die Aktivierung verschiedener Zielgene realisiert, deren Zuordnung zueinander aber nur wenig aufgeklärt ist. Der Ox40-Ligand konnte in Dendritischen Zellen bereits als Zielgen identifiziert werden, höchstwahrscheinlich reguliert über die gemeinschaftliche Aktivierung von STAT1 und NF κ B. Zusätzlich phosphoryliert TSLP in DCs auch STAT4, allerdings verglichen zu anderen DC-Stimulatoren (LPS oder CD40L) deutlich geringer. Da STAT4 in DCs die IL-12-Expression reguliert, liegt hier der Schluss nahe, dass darin die Ursache für das Fehlen von IL-12 in der TSLP-induzierten Immunantwort liegen könnte. Während STAT3 in DCs vorwiegend für die Expansion und die Differenzierung der Zellen verantwortlich ist, wird STAT5 eine entscheidende Rolle in der Induzierung einer TH₂-spezifischen, nicht aber einer TH₁-spezifischen Immunantwort zugeschrieben, ebenfalls wie STAT6 durch Expression TH₂-Zellen-anlockender Chemokine, z.B. CCL17. Die Reifung von Dendritischen Zellen wird meist über Beteiligung von Mitgliedern der MAPK-Familie induziert ([74], [84], [99], [8], [13]) Neben dem Ox40L wird über Mitglieder der NF κ B-Familie auch die Expression von IL-33 reguliert und stellt somit evtl. ein weiteres Zielgen von TSLP dar ([136]). Dieser Zusammenhang sollte auf mRNA- und Proteinebene untersucht werden. Untersuchungen an Zellen der glatten Muskulatur der Atemwege (HASM) geben Hinweise zur Rolle von TSLP-aktiviertem STAT3. So wird dessen Aktivierung über den MAP-Kinase-Signalweg realisiert, es induziert selbst die Expression von IL-6 und den Chemokinen IL-8 und Eotaxin und wirkt fördernd auf die Migration und damit die strukturelle Veränderung der Atemwegsmuskulatur ([129], [119]).

Die vielfältigen Effekte, welche TSLP in seinen Targetzellen auslöst, bestärken weiterhin die Bezeichnung als Schlüsselmolekül im entzündlichen Geschehen und unterstreichen damit die Wichtigkeit der Einflussnahme auf dieses Zytokin. Allerdings muss sich die Suche nach beeinflussenden Molekülen aufgrund der breiten Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege, mit der die Regulierung sehr unterschiedlicher Zielgene realisiert wird, bereits auf die spezifische Beeinflussung der extrazellulären Liganden-Rezeptor-Interaktion konzentrieren, z.B. durch Generierung von Antikörpern gegen Ligand und Rezeptor oder antagonistische Moleküle mit konkurrierenden Bindungseigenschaften.

4.2 Der Ox40-Ligand als wichtiges Zielgen der TSLP-induzierten Signalkaskade

Die Expression des Ox40-Liganden auf der Oberfläche von Dendritischen Zellen nach TSLP-Stimulation ist einer der wichtigsten Prozesse in der TSLP-vermittelten Immunreaktion. Im Zusammenspiel mit den Ko-Stimulationsfaktoren CD80 und CD86 induzieren DCs über diesen Oberflächenmarker die Proliferation von T-Zellen und deren Differenzierung zu inflammatorischen TH₂-Zellen. Ox40L stellt damit ein wichtiges Zielgen des TSLP-Rezeptors auf Dendritischen Zellen dar. Die Regulierung des Ox40L-Promoters und dessen Beeinflussung sollte deshalb im vorliegenden Teil der Arbeit untersucht werden. Unter Verwendung eines Reporterkonstruktes, welches die Luciferase-Expression unter die Kontrolle des Ox40L-Promoter stellt, konnte dessen TSLP-induzierte Aktivierung bestätigt werden. Mit bioinformatischen Methoden wurde bei der Untersuchung der Promotersequenz neben STAT-bindenden Sequenzen unter anderem auch Bindungsstellen für NF κ B-Signalmoleküle identifiziert. Arima et al. konnten deren Beteiligung an der Ox40L-Promoter-Aktivierung ebenfalls durch Promoter-Bindungsstudien in Dendritischen Zellen bestätigen ([8]). Welche dieser Signalmoleküle aber konkret für die Aktivierung des Promoters verantwortlich sind, könnte der Einsatz von spezifischen Signalwegsinhibitoren (niedermolekulare Inhibitoren oder siRNA) sowie die Anwendung von DNA-Protein-Interaktionsexperimenten wie EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) und ChIP (Chromatin-Immunpräzipitation) aufklären. Durch Verkürzung der Promoter-Region um jeweils 100 bp wurde der Bereich 300 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes als regulierend identifiziert. Durch die schrittweise Mutation einzelner Transkriptionsfaktor-Bindestellen in diesem Bereich oder deren Kombination kann ihre Rolle bei der Expression des Zielgens genauer definiert werden. Diese Herangehensweise wurde bereits bei anderen Promotoren angewendet, auf welchen Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren identifiziert wurden. Ausgehend von diesen Erkenntnissen ist es aber denkbar, dass eher ein Zusammenspiel zwischen STAT- und NF κ B-Molekülen als die Bindung eines alleinigen Faktors für die Promoter-Aktivierung verantwortlich ist ([104], [98], [170]). Untersuchungen an einem IFN γ - und TNF α -induzierten Zielgenpromoter geben Hinweise auf die direkte Wechselwirkung zwischen STAT- und NF κ B-Molekülen. Dabei bilden IFN γ -induziertes STAT1 und TNF α -induziertes p50 und p65 einen DNA-bindenden transkriptionsregulierenden Komplex ([45]). Da NF κ B-, RelA- und STAT1-Bindungsstellen auf dem Ox40L-Promoter im Bereich 50-70 bp stromaufwärts sehr nah beieinander liegen oder sogar überlappend, ist ein ähnlicher Mechanismus für die Ox40L-Expression denkbar.

Das generierte Ox40L-Promoter-Reporterkonstrukt konnte zusätzlich auch eingesetzt werden, um das Potential eines möglichen Inhibitors der TSLP-induzierten Signalwege direkt an einem Zielgen zu bestimmen. Es wurde ein Antikörper gegen die humane TSLPR α -Rezeptorkette generiert, welcher die TSLP-induzierten intrazellulären Signale auf Phosphorylierung- und genregulatorischer Ebene beeinflussen kann. Dieser Antikörper, bezeichnet als 1E10, ist in der Lage, die Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5 in BaF3-TSLPR-Zellen zu inhibieren ([17]). Mit den vorliegenden Versuchen konnte auf Reporterebene gezeigt werden,

dass die Aktivierung des Ox40L-Promoters durch 1E10 ebenfalls unterbunden wird, was das therapeutische Potential des Antikörpers zusätzlich unterstreicht. Somit konnten nicht nur Mitglieder des JAK/STAT-Signalweges sondern zusätzlich ein wichtiges Zielgen des TSLP-induzierten Signalwegs beeinflusst werden. Da das Potential dieses Antikörpers nicht nur am murinen Modellsystem BaF3-TSLPR bestätigt werden sollte, wurden die Untersuchungen auf humane Zelllinien und primäres Zellmaterial ausgeweitet. Die Zelllinie MUTZ-3 ist abgeleitet aus Zellen myeloider Leukämie und wird als immortalisiertes Äquivalent zu CD34+-Vorläuferzellen beschrieben. Unter Verwendung von IL-4, GM-CSF und $\text{TNF}\alpha$, Zytokine, welche *in vitro* und *in vivo* die Differenzierung dieser Zellen in Dendritische Zellen induzieren, weist diese Zelllinie Oberflächenmarker vergleichbar mit aus Monozyten abgeleiteten Dendritischen Zellen (MoDCs) auf und lässt sich darüber hinaus in reife (mature) Dendritische Zellen (mDCs) ausdifferenzieren ([90], [75]). In eigenen Vorversuchen konnte die Expression des TSLP-Rezeptors auf der Zelle zytometrisch nachgewiesen werden, ebenfalls ließ sich durch TSLP-Stimulation in Reporter-gen-Versuchen STAT1-Aktivierung induzieren, was das Potential der Zelllinie, als humanes Modellsystem verwendet werden zu können, bestätigt. Da die Kultivierung der Zellen sich als sehr schwierig herausstellte und die Zellen eine sehr hohe Verdopplungszeit (ca. 120 h) aufweisen, standen sie für weitere Versuche nicht in ausreichender Menge zur Verfügung, weshalb für diese primäres Zellmaterial genutzt werden sollte. Aus PBMC isolierte Monozyten wurden mit humanem GM-CSF und IL-4 über 7 Tage zu Dendritischen Zellen (DCs) ausdifferenziert. Die TSLP-induzierte Expression des Ox40L auf der Oberfläche sollte zytometrisch und durch Reporter-gen-Versuche reproduziert werden. Davon ausgehend sollte das Potential von 1E10, diese Expression zu inhibieren, untersucht werden. Obwohl sich die Expression des Ox40L durch LPS-Stimulation deutlich hochregulieren und zytometrisch nachweisen ließ und die Kontrolltransfektion der Dendritischen Zellen mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) erfolgreich war, ließen sich weder auf der Oberfläche der Zellen, noch auf genregulatorischer Ebene im Reporter-gen-Assay eine gesteigerte Ox40L-Expression nach TSLP-Stimulation nachweisen. Dadurch konnte das inhibitorische Potential von 1E10 nicht weiter untersucht werden. Mögliche Ursachen dafür könnten in der Generierung der Dendritischen Zellen liegen. In vorliegenden Publikationen wurden für die Versuche ausschließlich direkt aus dem Blut isolierte Zellen verwendet. Diese Technik stand allerdings nicht zur Verfügung, weshalb die aus Monozyten differenzierten Dendritischen Zellen (moDCs) verwendet wurden. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die Methode der Isolierung der CD14-positiven Monozyten als Vorläufer einen Einfluss auf bestimmte Eigenschaften der aus diesen Zellen generierten DCs hat. So exprimieren die moDCs, welche aus über anti-CD14-gecoateten Beads angereicherten Monozyten abgeleitet wurden, deutlich geringere Konzentrationen der immunreaktiven Cytokine IL-10, IL12 und $\text{TNF}\alpha$, als wenn die Anreicherung der Monozyten über ihre Adhärenz an Plastik in der Zellkulturflasche erfolgt ist. Unterschiede in der Expression der Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 aufgrund der Methode der Anreicherung ließen sich hingegen nicht erkennen ([39]). Bei dem Vergleich von Monozyten-abgeleiteten DCs (MoDCs) mit aus dem Blut isolierten DCs (BDCs) ließen sich Unterschiede hinsichtlich der endozytotischen Aktivität und der Chemokin- und Zytokin-Expression feststellen, sie verhielten sich aber vergleichbar

bei der Expression der Ko-Stimulierungsmarker CD80 und CD86 und der Stimulierung der T-Zellen-Proliferation ([41]). Weiterhin gibt es Hinweise, dass Monozyten abgeleitete DCs nach TSLP-Stimulation weder mit Zytokin- noch mit Oberflächenmarkerexpression reagieren. Erklärt wird dies mit der fehlenden Expression des TSLP-Rezeptors auf den Zellen, im Gegensatz zu frisch isolierten Dendritischen Zellen (Würtzen et al. 2011, Kongressbeitrag American Academy of Allergy Asthma and Immunology, AAAAI 2011). Schon bereits die Hinweise auf TSLP-Rezeptor-Expression auf den isolierten Monozyten sind sehr kontrovers, so konnte diese teilweise, wenn auch nur in sehr geringen Maße nachgewiesen werden ([53]), in eigenen Experimenten allerdings nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt, Promotionsarbeit Tina Vetter, 2013 [146]). Zusammengenommen weisen diese Daten darauf hin, dass die Herkunft der Dendritischen Zellen sowie die Methode der Isolierung und Differenzierung einen großen Einfluss auf die Ergebnisse der mit ihnen durchgeführten Versuche hat. Auch im Hinblick auf die Expression des TSLP-Rezeptors auf den DCs und Monozyten sollten die geplanten Versuche zur Anwendung des inhibitorischen Antikörpers 1E10 deshalb möglichst mit frisch isolierten DCs durchgeführt werden. Die zu verwendenden myeloiden DCs (mDCs) machen allerdings nur 0,5 % der Gesamtzellzahl in PBMCs aus, aus einer Vollblutkonserve können damit nur ca. $5 \cdot 10^5$ Dendritische Zellen gewonnen werden ([8]). Betrachtet man den Bedarf von Zellen in verschiedenen zu verwendenden Methoden (mind. $2 \cdot 10^4$ Zellen pro Meßpunkt für Reporterassays, $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Probe im Western Blot), erkennt man schnell, dass hier eine große Menge Vollblutkonserven benötigt werden, wenn es nicht möglich ist, ein vergleichbares Modellsystem zu etablieren.

Neben dem Zytokin TSLP werden aktuell weitere Zytokine diskutiert, welches ebenso weitreichende Aufgaben in der allergischen Entzündung einnehmen wie TSLP. Die Zytokine IL-33 und IL-25 stehen aktuell damit verstärkt im Fokus der Forschung und müssen bei der Betrachtung der pathophysiologischen Prozesse im Zusammenspiel mit TSLP gesehen werden. Wie TSLP wird IL-33 von verschiedenen Zelltypen exprimiert, wie z.B. epitheliale Zellen, Zellen der bronchialen Muskulatur, Endothelzellen der Lunge sowie Haut-Keratinocythen ([11]). *In Vivo* können erhöhte Level von IL-25 und IL-33 in Lungenbiopsien und BAL-Flüssigkeiten von Asthmatikern, ebenso wie in Gewebeproben der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis gemessen werden und korrelieren mit der Schwere der Erkrankung ([113], [112], [31]). Mastzellen werden neben TSLP auch durch IL-33 stimuliert. Da diese nach IgE-Stimulation zusätzlich in der Lage sind, selbst IL-33 zu sezernieren, wird hier scheinbar ein verstärkender Feedback-Loop aufgebaut. Ein Hinweis darauf, ob die IL-33-Produktion von Mastzellen durch TSLP-Stimulation erhöht wird, konnte bis jetzt nicht gefunden werden. IL-33 selber induziert zwar die Expression von inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-4 und IL-5 in Mastzellen, nicht aber die Expression von TSLP ([55]). Weiterhin ist IL-33 in der Lage, ebenso wie TSLP, Dendritische Zellen zu rekrutieren und zu aktivieren, was in verstärkter Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie des Ox40L auf der Oberfläche und in verstärkter Sekretion der inflammatorischen Cytokine IL-6, IL-1 β und TNF α resultiert. Ebenso wie TSLP-aktivierte DCs sind IL-33-aktivierte DCs deutlich potenter als uninduzierte DCs, die Aktivierung von naiven T-Zellen zu TH₂-Zellen zu induzieren ([14]). Bei allergischen Reaktionen

gegen Hausstaubmilben und Erdnüssen wird TSLP sogar durch IL-33 ersetzt und spielt in der nachfolgenden Immunantwort keine Rolle, die Aktivierung der DCs erfolgt ausschließlich über IL-33 und die Allergene selber ([29]).

IL-25, welches zu der Familie der IL-17-Zytokin-Familie zählt, wird neben epithelialen Zellen, ausgelöst durch Allergenkontakt, auch von TH₂-Zellen, Mastzellen, Makrophagen und Granulozyten sezerniert. In TH₂-Zellen induziert IL-25 die Expression von IL-4 und verstärkt deren Differenzierung ([7], [148]). Die Funktionen von IL-25 im allergisch-entzündlichen Geschehen sind ebenso weitreichend wie die von TSLP. Es induziert in Dendritischen Zellen, Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NKT) und TH₂-Zellen vorwiegend die Expression von IL-4, IL-5 und IL-13, bewirkt zusätzlich die Expression des OX40L auf Dendritischen Zellen. Epitheliale Zellen der Lunge werden zur Produktion von Chemokinen und auch TSLP angeregt. Weiterhin erhöht IL-25 das Level von IgE im Serum und die Menge an pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen sowie die Anzahl der schleimproduzierenden Becherzellen und induziert zusätzlich das Einwandern von Eosinophilen und Makrophagen in die Atemwege ([11], [151]). Besonders durch die Induzierung der IL-13-Expression durch verschiedene Zellpopulationen sind IL-25, IL-33 und TSLP maßgeblich an der Fibrosierung und der strukturellen Veränderung des Lungengewebes beteiligt. Diese Ergebnisse werfen natürlich die Frage auf, unter welchen Umständen IL33, IL-25 oder TSLP bei Allergenkontakt aktiviert werden und wieso diese Cytokine eine derart redundante Funktion im Asthmageschehen ausüben. Da einige Publikationen auf die Aktivierung der Immunkaskade durch IL-33, TSLP und IL-25 gemeinsam hinweisen, während in anderen nur eines der Zytokine aktiviert wird, während die anderen Zytokine gar nicht exprimiert werden, wird ebenfalls zu untersuchen sein, inwiefern die Ausschüttung dieser Zytokine im Zusammenspiel gesteuert wird.

Hinsichtlich der Signaltransduktion zeigen sich weitere Parallelen zum TSLP. Während IL-25 keine Signalwege mit TSLP teilt, wird für IL-33 ebenfalls eine Aktivierung von NF κ B und des MAP-Kinase-Signalweges in Mastzellen und Eosinophilen beschrieben, worüber besonders die Expression von Chemokinen (CXCL8, CCL2) und IL-6 induziert wird. ([124], [28], [148]). Die Induzierung der Expression des Ox40L auf Dendritischen Zellen wird für TSLP wie auch für IL-25 und IL-33 beschrieben. TSLP-induzierte Dendritische Zellen aktivieren diese über die Aktivierung von p50, p52, RelA und RelB als Mitglieder des NF κ B-Signalweges ([8]). Vergleichbare Daten wurden für IL-25 wie auch für IL-33 bis jetzt nicht veröffentlicht. Es wird allerdings die Expression von IL-33 in aktivierten Dendritischen Zellen durch Mitglieder des NF κ B-Signalwegs beschrieben ([136]). Durch diese Überlagerung der Signalwege ist ebenfalls denkbar, das TSLP in DCs auch die Expression von IL-33 reguliert. IL-33 als Targetgen von TSLP sollte daher untersucht werden. Hierzu sollte die Expression von IL-33 auf mRNA- und Proteinebene durch Realtime-PCR und ELISA in TSLP-stimulierten DCs gemessen sowie die Aktivierung des Promoters für IL-33 untersucht werden.

4.3 Die TSLP-Mutante W148A

Grundlegende Voraussetzung für die Anwendung eines mutierten Zytokins als Therapeutikum ist die Eigenschaft, die spezifische Rezeptorkette vergleichbar dem Wildtyp binden zu können, damit dessen Bindungsstelle konkurrierend zu besetzen und durch verringerte oder fehlende Rekrutierung der zweiten Rezeptorkette keine oder nur verringerte intrazelluläre Signale auszulösen. Unter diesen Vorgaben und unter Berücksichtigung von Erkenntnissen aus Mutationsstudien am humanem IL-4 und IL-7 sollten im vorliegenden Teil Bereiche des TSLP definiert werden, welche für die Bindung der IL-7R α -Kette zuständig sind und diese anschließend über Aminosäure-Austausch zu mutieren. Unter Verwendung von Strukturvorhersageprogrammen wurde TSLP ebenfalls als 4-Helixbündel-Zytokin charakterisiert. Ausgehend von Studien an IL-4 und IL-7 wurde die D-Helix ebenfalls als die Domäne vorhergesagt, welche zur Generierung einer antagonistischen TSLP-Variante verändert werden sollte. Für IL-7 wurde eine Mutante beschrieben, welche durch Mutation des Tryptophan, lokalisiert in der D-Helix an Position 143, eine geringere Aktivität aufwies ([144]). Vergleichende Untersuchungen zur Aminosäuresequenz von TSLP der Maus, des Menschen und des Pferdes zeigen ebenfalls ein konserviertes Tryptophan im c-terminalen Bereich der D-Helix. Dieses Tryptophan an Position 148 der TSLP-Sequenz wurde als Startpunkt für Mutationsanalysen gewählt und zunächst gegen Alanin ausgetauscht. Im Bakteriendisplay wurde diese Variante W148A als kaum aktiv charakterisiert, die lösliche rekombinante Variante des Proteins induziert im Aktivitätsassay vergleichbare Aktivität, wobei dazu deutlich höhere Konzentrationen des Proteins eingesetzt werden müssen.

Aktuellste Untersuchungen zur Struktur des murinen TSLP, durchgeführt von Verstraete et al. geben unter Verwendung von Kristallographie und bioinformatischen Sequenzanalysen klare Kenntnisse über die Struktur und die Bindemechanismen, welche in der Interaktion von TSLP und TSLP-Rezeptor stattfinden und höchstwahrscheinlich auch auf das humane System übertragen werden können ([145]). Ausgehend von diesen Daten können neue Strategien zur Beeinflussung der Zytokin-Rezeptor-Interaktion für humanes TSLP überlegt werden. Die von Leonard et al. getroffene, und in dieser Arbeit durch Struktur-Vorhersage-Programme bestärkte Annahme, dass TSLP zu der Familie der 4-Helix-Bündel-Zytokine gezählt werden kann, wird durch die Daten der Kristallographie des murinen TSLPs bestätigt ([79]). Dabei wurden zwei Regionen an dem Zytokin identifiziert, welche für die Bindung des Proteins an die beiden Rezeptorketten (IL-7R α und TSLPR α) verantwortlich sind. Zur Bildung eines aktiven Liganden-Rezeptor-Komplexes erfolgt die Bindung des Proteins an die spezifische TSLPR α -Kette über eine Vielzahl polarer Aminosäuren in der *Site I*, welche Regionen der A-Helix, der D-Helix und des Loops zwischen A- und B-Helix beinhaltet. Die anschließende Rekrutierung der IL-7R α -kette zur Ausbildung eines funktionalen Rezeptors erfolgt über die *Site II* des TSLP, bestehend aus Teilen der A- und der C-Helix, insbesondere über die Interaktion des Isoleucin an Position 37 mit einer hydrophoben Tasche in der IL-7R α -Kette. Vorläufige Mutationsstudien in den Interaktionsbereichen zwischen TSLP und den Rezeptorketten bestätigten diese Bindemechanismen. Der Austausch von Aminosäuren in der *Site I* des

Proteins führt zu stark reduzierter Affinität zur TSLP α -Rezeptorkette und damit verringerter Rezeptorbindung. Die Mutation von Isoleucin an Position 37 in der *Site II* resultiert in unveränderter Bindung der TSLP α -Kette bei fehlender Rekrutierung der IL-7R α -Kette. Folgend bildet sich kein funktionaler Rezeptorkomplex mit intrazellulärer Aktivität aus.

Ausgehend von diesen Daten liegt der Formierung des TSLP-TSLP α -Komplexes eine andere räumliche Ausrichtung des Moleküls zu Grunde, als bei anderen Zytokinen der gleichen Familie. IL-13 bindet über seine A- und C-Helix an die IL-13R α -Kette als spezifische Kette und rekrutiert anschließend über die D-Helix die IL-4R α - oder die IL-13R α 2-Rezeptorkette ([86]). Vergleichbar verhält es sich bei der Interaktion zwischen IL-4 und IL-7 und deren spezifischen Rezeptor. In beiden Fällen wird die Bindung des Liganden an die spezifische Rezeptorkette über die *Site I* des Zytokins realisiert, bestehend aus Teilen der A- und der C-Helix, während die D-Helix der *Site II* für die Rekrutierung und die Bindung der unspezifischen Rezeptorkette verantwortlich ist. Dadurch formiert sich ein intrazellulär signalinduzierender Rezeptorkomplex ([72], [91]). Die Annahme, dass, ausgehend von Erkenntnissen von den strukturell verwandten Zytokinen IL-4 und IL-7, Aminosäuren der D-Helix für die Rekrutierung der zweiten, unspezifischen Rezeptorkette, welche für die Formierung eines funktionalen Rezeptor-Liganden-Komplexes benötigt wird, verantwortlich ist, muss aufgrund der aktuellen publizierten Ergebnisse als falsch angesehen werden. Verstraete et al. beschreiben das Tryptophan (Position 148 im humanen TSLP, Position 132 in murinen TSLP), welches aufgrund seiner spezieübergreifende Konservierung als Target für die Mutation gewählt wurde, als Aminosäure, welche nicht für die Bindung von Rezeptoren sondern für die Ausbildung der räumlichen Struktur des Proteins verantwortlich ist. Es ist in das Zentrum des 4-Helix-Kerns gerichtet und steht in Wechselwirkung mit einem Threonin in der B- (Position 71) und einem Threonin in der C-Helix (Position 90). Die geringere Aktivität der in dieser Arbeit produzierten Variante TSLP W148A resultiert damit also nicht wie erhofft in einer geringeren Rekrutierung der IL-7R α -Kette sondern in einer veränderten räumlichen Protein-Struktur. Da die Proteinbindung an die TSLP α -Kette, nachgewiesen im ELISA, und die Erkennung des Proteins durch TSLP-spezifische Antikörper in ELISA und Western Blot erfolgreich waren, scheint die Tertiärstruktur der Mutante nicht völlig zerstört. Aus diesen Erkenntnissen lässt sich erklären, wieso sich das mutierte TSLP in der Aufreinigung anders als das wildtypische Protein verhielt, was insbesondere durch starkes Ausfallen des Proteins bei der Rückfaltung sichtbar wurde. Die zusätzlichen Fragmenten bei der Aufreinigung, wie sie im Silbergel und auch im Western Blot zu sehen sind, werden als Spaltprodukte diskutiert. Eventuell sind durch die fehlende intra-strukturelle Bindung zusätzliche Angriffsstellen für Proteasen zugänglich. Diese Überlegung wird bestärkt durch eine leichte Verringerung der Spaltprodukte durch Einsatz von Proteasehemmern bei der Aufreinigung.

Aufbauend auf dem neuen Wissen über die Struktur vom murinen TSLP und dessen Bindemechanismus an seinen Rezeptor können neue Strategien zur Generierung von humanen antagonistischen TSLP-Varianten überlegt werden. Die zu mutierenden Aminosäuren wären demnach in der A- und C-Helix des TSLP lokalisiert. Lysin (Pos. 32), Isoleucin (Pos. 33 und 37), Asparaginsäure (Pos. 41 und 45) in der A-Helix, sowie Arginin (Pos. 89) und Glutaminsäure (Pos. 92) in der C-Helix des murinen TSLP stehen über die Ausbildung von

van-der-Waals-Kräften in Kontakt zu benachbarten Aminosäuren der IL-7R α -Kette ([145]). In der Aminosäuresequenz sind sie jeweils eine Position vor den Aminosäuren lokalisiert, welche über alle Spezies hinweg konserviert sind und aufgrund fehlender Wechselwirkungen zu Bereichen des assoziierten Rezeptors eher für die Ausbildung der Struktur des TSLP zuständig sind. Die Mutation des Isoleucin (Position 37) und die daraus resultierende fehlende Aktivität geben Anhaltspunkte darauf, dass vergleichbare Mutationen im humanen TSLP ähnliche Effekte erzielen können. Dazu wird eine Mutation der folgenden Aminosäuren vorgeschlagen: Lys38, Ala42, Trp46, Ile47, Asp50, Tyr54 und Lys103, zunächst durch Austausch gegen Alanin und folgend bei vielversprechenden Positionen durch den Einbau neuer Aminosäuren mit veränderten Eigenschaften hinsichtlich Polarität, Hydrophobizität und räumlicher Struktur.

Das Zytokin IL-4, welches ebenfalls eine große Rolle im asthmatischen Geschehen spielt, ist strukturell bereits vollständig erforscht und die Erkenntnisse über dessen Struktur und die daraus folgende Suche nach einer inhibitorischen Variante kann als Vorlage für die weiteren Schritten für TSLP dienen. Es wurde eine Mutante von IL-4 erzeugt, in welcher zwei Aminosäuren der D-Helix (Pos. 121 Arginin gegen Asparaginsäure und Pos. 124 Tyrosin gegen Asparaginsäure) ausgetauscht wurden. Diese IL-4-Doppelmutante (auch Pitakinra, AER 001, Aerovant oder BAY 16-9996 genannt) befindet sich bereits in der klinischen Phase-II-Untersuchung und ruft bei Patienten mit eosinophilem Asthma eine Verbesserung der Symptome und Reduktion der Asthmaanfälle hervor. Die Applikation erfolgte in diesen Studien subkutan, wie auch als Aerosol ([142], [150]). Zusätzlich wird auch die Applikation der Mutante als DNA diskutiert. Dabei wird der Ansatz der Gentherapie verfolgt, durch Einbau der DNA für die mutierte Variante in die Wirts-DNA kann ein dauerhaftes Level in Patienten erreicht werden ([100]). Am Beispiel von BMP-2 wird gezeigt, dass es für die Eigenschaft als Kompetitor zuträglich ist, wenn Mutationen in beide rezeptorbindenden Domänen eingebracht werden. Für BMP-2 wurde an der BMPRIA-Kette-bindenden Domäne eine Aminosäure ausgetauscht, wodurch diese Kette mit höherer Affinität gebunden wird. Die Bindestelle wird konkurrierend besetzt gehalten und somit unzugänglich für das wildtypische Protein gemacht. Die zweite Mutation in dem Bereich, welcher für die Rekrutierung der zweiten, signalauslösenden BMPRIIA-Kette verantwortlich ist, reduziert das ausgelöste intrazelluläre Signal ([67]). Eine solche Kombination von Mutationen in den A-, C- und D-Helices des TSLP zur Generierung eines Super-Antagonisten wäre denkbar.

Neben dem Einsatz von antagonistischen Zytokinen sind weitere Möglichkeiten zur spezifischen Beeinflussung der Liganden-Rezeptor-Bindung möglich. Mitarbeiter der AG Virchow an der Uniklinik Rostock generierten sieben verschiedene Antikörper gegen das humane TSLP. Bei den Untersuchungen zur Faltung des TSLP-W148A durch Bindung verschiedener TSLP-Antikörper fiel der Antikörperklon 1F2 auf. Er konnte das wildtypische Protein schwach im ELISA und im Western Blot binden, allerdings für deutlich höher konzentriertes mutiertes TSLP kein Signal liefern. Daraus könnte geschlossen werden, dass dieser Antikörper genau den Bereich des Proteins als Epitop bindet, welcher durch Aminosäure-Austausch mutiert wurde. Zur genaueren Lokalisierung der Antikörperbindung sollten zunächst einzelne Helices des TSLP löslich produziert werden, evtl. als Fusionsprotein mit MBP-Tag. Diese können in Western

Blots und ELISA weitere Informationen über die gebundenen Epitope liefern. Ausgehend von den inzwischen bekannten Strukturdaten würden Antikörper, welche die A-, C- oder die D-Helix des TSLP binden, damit die TSLP-TSLPR-Komplexierung stören und damit potentiell inhibitorische Eigenschaften aufweisen. Eine Verwendung der einzelnen Helices (insbesondere der A-Helix, welche die Bindung der TSLPR α -, sowie der IL-7R α -Kette vermittelt) als blockierende und um die Bindungsstellen der Rezeptorketten mit dem wildtypischen Protein konkurrierende Moleküle sollte ebenfalls untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit der Einflussnahme auf die TSLP-induzierte Rezeptoraktivierung wäre die Verwendung einer löslichen Rezeptordomäne. Für das murine TSLP wurde bereits ein Fusionsprotein bestehend aus der extrazellulären Domäne der murinen TSLPR α -Rezeptorkette und dem Fc-Teil des IgG2a-Antikörpers generiert. Der Einsatz dieses Proteins im OVA-induzierten Mausmodell konnte auf DCs die Oberflächenexpression verschiedener ko-stimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 verringern und weiterhin die Level von IgE, IL-4 und IL-5 in der Lunge reduzieren ([161]). Für den humanen TSLP-Rezeptor ist bereits eine lösliche extrazelluläre Domäne produziert worden. Diese wurde zur Generierung eines inhibitorischen Antikörpers gegen die TSLPR α -Kette produziert ([17]). Funktionelle Assays zeigten bereits die Bindung des Proteins an TSLP, eine Charakterisierung der inhibitorischen Eigenschaften steht allerdings noch aus. Das Modellsystem BaF3-TSLPR, welches im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung der Signaltransduktion des TSLP-Rezeptors und der Wirksamkeit der TSLP-Mutante verwendet wurde, kann sowohl zur Charakterisierung der potentiell inhibitorischen Rezeptor- und Zytokindomänen, wie auch der TSLP-Antikörper eingesetzt werden.

4.4 Hybridrezeptoren auf der Basis des TSLP-Rezeptors

Das in diesem Teil der Arbeit vorgestellte Rezeptorhybrid-System basiert auf der zuvor untersuchten Signaltransduktion des TSLP-Rezeptors und stellt eine biotechnologische Anwendung von den gewonnenen Erkenntnissen und dazu verwendeten Methoden dar. Dabei wird über den Austausch der extrazellulären Domänen die intrazelluläre Signalkaskade des TSLP-Rezeptors über einen neuen Liganden induziert. Trotz seiner breiten Adaptierbarkeit in die verschiedenen Rezeptorfamilien (Zytokinrezeptoren, Rezeptor-Tyrosinkinasen und Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren) weist das System Grenzen auf. Nicht jede neu eingebrachte Kombination aus extrazellulärer Domäne und intrazellulärem TSLP-Rezeptor resultierte in einem durch den entsprechenden Liganden induzierbaren System. Es konnten in der Familie der Zytokinrezeptoren mehrere Hybride funktionell generiert werden (m/hIL-7R, rIL-4R, hIL-13R). Der strukturell sehr verwandte murine TSLP-Rezeptor wies aber nur geringe Induzierbarkeit auf. In der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen konnten mit Hybriden für hPDGF α und m/hM-CSF funktionelle Beispiele geschaffen werden. Hybride mit extrazellulärem CD40- und EGF-Rezeptor wiesen trotz vergleichbarer Zelloberflächenexpression keine Aktivität auf. In der Familie der Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren gelang die Generierung eines funktionalen Hybrids nur durch Orientierungsoptimierung der transmembranen- und intrazellulären Bereiche

des TSLP-Rezeptors durch das Einfügen von Aminosäuren in die Transmembrandomäne. Im Fall von Hybridrezeptoren besteht durch die Kombination von zwei verschiedenen Rezeptorketten die Möglichkeit, dass die Konformation und Orientierung der Rezeptorketten zueinander nicht funktionell ist. Einige Arbeitsgruppen weisen an verschiedenen Beispielen darauf hin, dass die Orientierung der intrazellulären Domänen zueinander wichtig ist für das induzierte Signal und diese durch Einfügen von zusätzlichen Aminosäuren beeinflusst werden kann ([47], [20], [135]). Für die chimären Rezeptoren TGF β R/TSLPR und BMP2R/TSLPR konnte durch das Einfügen von 2 Aminosäuren in den n-terminalen Bereich der Transmembrandomäne beider Rezeptorketten die ligandeninduzierte Aktivität des Rezeptors deutlich gesteigert werden. Für den TPO-Rezeptor kann durch eingefügte Aminosäuren sogar eine ligandenunabhängige Dimerisierung und Aktivierung erreicht werden. Dies konnte bei den hier untersuchten Rezeptorsystemen nicht bestätigt werden.

Neben diesen Parametern hat auch der native Binde- und Aktivierungsmechanismus des Liganden an seinen Rezeptor einen großen Einfluss auf die Funktionalität des chimären Rezeptors. Grundsätzlich können zwei Mechanismen unterschieden werden, wie Rezeptoren durch Liganden-Bindung aktiviert werden können ([9]). Aktuelle Veröffentlichungen zur Struktur des murinen TSLP-Rezeptors lassen darauf schließen, dass es sich bei der Aktivierung durch TSLP um eine ligandeninduzierte Rezeptor-Dimerisierung handelt. Es wird zunächst ein TSLP-TSLPR α -Komplex ausgebildet und anschließend über eine Wechselwirkung von TSLP mit der IL-7R α -Kette eine Dimerisierung der beiden Rezeptorketten etabliert ([145]). Aufgrund ähnlicher Bindemechanismen erklärt sich, wieso die einfache Adaption des Hybridsystems auf weitere Vertreter der Familie der Zytokinrezeptoren (m/hIL-7R, rIL-4R, hIL-13R, hIL4-R) möglich war. Die Aktivierung des EPO-Rezeptors ist ein Beispiel für den zweiten möglichen Mechanismus. Der Ligandenbindung geht eine Interaktion der Transmembrandomänen der Rezeptorketten voraus, welche einen Rezeptorkomplex vorformen, in welchen anschließend der Ligand bindet ([30]). Durch diese Bindung bewegen sich die extrazellulären Domänen aufeinander zu und erzeugen damit eine relative Rotation der intrazellulären Domänen zueinander und ermöglichen so eine Transphosphorylierung der assoziierten Kinasen. Ob der TSLP-Rezeptor vor Ligandenbindung einen ähnlichen Komplex ausbildet, wurde bis jetzt nicht untersucht. Untersuchungen zur Struktur des EGF-EGFR-Komplexes, welcher ebenfalls als chimärer EGFR/TSLPR-Rezeptor generiert wurde, geben mögliche Erklärungen zu dessen geringer Aktivierbarkeit als Hybridrezeptor. EGF liegt in diesem Rezeptorkomplex als Dimer vor und bindet damit zwei EGFR-Ketten. Während die Domänen 1-3 des Rezeptors für die Bindung des Liganden verantwortlich sind, bildet die Domäne 4 die Verbindung zwischen ligandenbindender und transmembraner Domäne. Verglichen zu anderen Rezeptortyrosinkinasen besteht kaum Interaktion der beiden vierten Domänen des Rezeptordimers nach der Ligandenbindung, wodurch die intrazellulären Bereiche des TSLP-Rezeptors nicht in eine für Signalinduzierung ausreichende Nähe gebracht werden können ([102]). Diese fehlende räumliche Nähe kann sich auch aus der Größe des gebildeten extrazellulären Komplexes ableiten. Ein aktiver EGF-EGFR-Komplex ist 149 kDa groß (Größe EGF 6 kDa als monomeres Protein, vorliegend als Dimer plus 2 extrazelluläre Domänen des EGFR à 68,6 kDa), während der

TSLP-TSLPR-Komplex nur eine Größe von 63 kDa (extrazelluläre Domäne TSLPR α 24,1 kDa, extrazelluläre Domäne hIL-7R α 25 kDa, TSLP 14 kDa) aufweist.

Bei dem Rezeptor für TGF β handelt es sich um einen hetero-tetramerischen Komplex, bei dem ein dimerisiertes TGF β von zwei ALK5- und zwei TGF β RII-Rezeptorketten gebunden wird ([155]). Dadurch bilden die intrazellulären Domänen anders als beim nativen TSLP-Rezeptor ebenfalls einen tetramerischen Komplex. Zusätzlich wirkt bei der natürlichen Bindung von TGF β an seine Rezeptorketten das komplexstabilisierende Membranprotein Betaglycan mit, welches in dem Hybridrezeptoransatz nicht angeboten wird ([89]). Wieso allerdings durch das Einfügen von 2 AS in die Transmembrandomäne, welches in einer Drehung der intrazellulären Domänen um 220° resultiert, wieder ein Signal ausgelöst werden kann, muss genauer untersucht werden. Zu vermuten wäre, dass die JAK- und STAT-bindende Bereiche der intrazellulären Domäne, welche zuvor durch die Bildung eines Tetramers nicht zugänglich waren, durch Rotation wieder für die Bindung von JAKs und folgender STAT-Aktivierung erreichbar sind. Die Erweiterung der Palette an Hybridrezeptoren wird weitere Erkenntnisse über die Funktionsweise der Hybridrezeptoren liefern. Es wäre hilfreich, auf Basis der Binde- und Aktivierungsmechanismen der Zielstrukturen Voraussagen über die entstehende Struktur des Hybrides und dessen Funktionalität vor der Klonierung treffen zu können, um den Erfolg zu Beginn des Projekts abschätzen zu können.

Alle generierten chimären Rezeptoren besitzen einen n-terminalen P5D4-Tag ([71]). Dieser kann von einem spezifischen Antikörper gebunden werden und somit zum Expressionsnachweis auf der Zelloberfläche genutzt werden. Zusätzlich ist dieser α P5D4-Tag-Antikörper auch in der Lage, zwei Rezeptorketten, welche beiden den Tag tragen, zu dimerisieren. Vergleichbare Ergebnisse konnten schon zur Dimerisierung des TPO-Rezeptors durch einen angefügten FLAG-Tag und entsprechenden Antikörper gezeigt werden ([94]). Durch die Dimerisierung kann ein intrazelluläres Signal, welches sich im Reportergen- oder Proliferationsassay messen lässt und Aufschluss über die Funktionalität des Rezeptors gibt, ausgelöst werden, sogar in Abwesenheit des ursprünglich benötigten Liganden. Mit diesem Ansatz kann die Funktionalität des Hybridrezeptors bereits vorab ohne Ligand bestimmt werden, was das System besonders attraktiv macht in der Anwendung als Bioaktivitätstest für zu produzierende Zytokine.

Die Idee, die extrazelluläre Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung und -aktivierung von der intrazellulären Signalweiterleitung zu entkoppeln wurde schon oft angewendet, um einen schwer detektierbaren, zu untersuchenden extrazellulären Effekt auf einen bekannten Signalweg umzuleiten ([127], [103], [69]). Neu ist hingegen der Ansatz, die intrazelluläre Domäne eines Rezeptors als Basis für Hybride aus verschiedenen Rezeptorfamilien zu verwenden und damit ein leicht adaptierbares 'Baukasten'-System zu etablieren, welches durch den einfachen Austausch der extrazellulären Bereiche an eine neue Fragestellung adaptiert werden kann. Das Potential und die vielseitige Anwendung des Hybridrezeptorsystems konnte an einigen Beispielen bereits präsentiert werden. Weitere Anwendung finden kann das Prinzip unter anderem bei der funktionalen Suche nach Inhibitoren für Liganden-Rezeptor-Interaktionen, als Bioaktivitätstests für Zytokine, der Charakterisierung von funktionalen Antikörpern sowie bei der Überprüfung der Funktionalität und Struktur von extrazellulären, löslichen Domänen und deren inhibitorischen

Eigenschaften.

5 Zusammenfassung

Zytokine als sezernierte Botenstoffe sind ein wichtiger Teil der Kommunikation zwischen Zellen im Organismus. Durch Bindung von membranständigen Rezeptoren auf ihren Zielzellen induzieren sie Proliferation, Differenzierung und verschiedene zellphysiologische Vorgänge. Die Fehlregulierung dieser Prozesse durch verminderte oder erhöhte Expression der Zytokine und ihrer spezifischen Rezeptoren ist Ursache für viele Krankheitsbilder und bildet damit einen therapeutischen Hauptangriffspunkt. Besonders die Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen Zytokinen und ihren Rezeptoren durch Antikörper sowie Antagonisten und Agonisten bietet hierfür einen spezifischen Ansatz. Zur funktionellen Charakterisierung solcher biologisch aktiven Proteine, genannt ‚*biologicals*‘, ist es nötig, ein spezifisches Read-Out-System zur Verfügung zu haben, welches die durch die Liganden-Rezeptor-Interaktion ausgelöste Aktivität *in vitro* nachbildet. Die Anforderungen an dieses System sind eine einfache und flexible Adaptierbarkeit an neue Zielmoleküle sowie die reproduzierbare Aktivitätsbestimmung der untersuchten Proteine mit geringem Kosten- und Zeitaufwand.

Ein solches System wurde unter Verwendung von chimären Hybridrezeptoren auf der Basis der intrazellulären Bereiche des humanen Rezeptors für TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*) aufgebaut. Durch deren Fusion mit extrazellulären Domänen von Rezeptoren aus der Familie der Zytokinrezeptoren, der Rezeptortyrosinkinasen und der Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren ließen sich beispielhaft funktionelle Hybridrezeptoren aufbauen, welche zur Bestimmung der Aktivität von Liganden und potentiell inhibitorischer Agenzien verwendet werden konnten. Die Bandbreite der bisher generierten Hybridrezeptoren weist auf das Potential dieses Systems hin, weitere Bioaktivitätsassays generieren zu können, um bei der Identifizierung von therapeutisch relevanten Proteinen zur Behandlung von dys-regulierten Liganden-Rezeptor-Interaktionen einen Beitrag zu leisten.

Dem vorausgehend sind im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich der Signaltransduktion des Rezeptors für das Zytokin TSLP und der Aktivierung seiner Zielgenen neue Erkenntnisse gewonnen worden. Diese untermauern die Komplexität der induzierten intrazellulären Prozesse und beteiligten Signalwege und bestärken damit die Annahmen, die TSLP als einen der Schlüsselfaktoren der asthmatisch-entzündlichen Erkrankungen definieren.

Für die Beeinflussung der Interaktion zwischen TSLP und seinem Rezeptor wurden in dieser Arbeit zwei Herangehensweisen verfolgt. Durch Etablierung eines Reporter-gen-basierten Read-Outs konnte das inhibitorische Potential des Antikörpers 1E10, gerichtet gegen die TSLP α -Rezeptorkette des TSLP-Rezeptors erstmals anhand der Beeinflussung eines TSLP-Zielgen-Promoters (Ox40-Ligand) bestätigt werden. Durch eine gerichtete Mutation in der Aminosäuresequenz des Zytokins TSLP konnte eine mutierte Variante des TSLP generiert

werden, welche eine deutlich verringerte biologische Aktivität aufwies. Ausgehend von diesen Erkenntnissen im Zusammenhang mit neuesten publizierten Daten zur Struktur des TSLP wird in dieser Arbeit ein Konzept vorgestellt, wie durch die Generierung von antagonistischen TSLP-Varianten ein therapeutischer Ansatz zur Beeinflussung TSLP-induzierter allergischer und asthmatischer Entzündungen gefunden werden kann.

Summary

Cytokines as secreted signaling molecules are a very important component of the communication between cells in the organism. By binding of membrane-bound receptors on their target cells they induce proliferation, differentiation and various physiological processes. Dys-regulation of these processes by up- or down-regulated expression of cytokines and their receptors is one major cause of many diseases and thus, a major therapeutical target. One approach is the interference with cytokine / cytokine receptor interactions by antibodies and antagonistic and agonistic molecules. To functionally characterize such proteins, also called 'biologicals', a specific read-out system is needed that can represent ligand receptor interactions *in vitro*. The specification of this system should allow for easy adaption to new targets and should be highly reproducible in measuring the biological activity of target proteins at low costs and minimal effort.

Utilizing chimeric receptors based on the intracellular domains of the TSLP (Thymic Stromal Lymphopoeitin) receptor such a system was established. By fusion with extracellular domains of receptors from families of cytokine receptors, tyrosine-kinase receptors and serine/threonine-kinase receptors functional hybrid receptors were generated and used for activity measurement of their ligands and potential inhibitory molecules. The spectrum of hybrid receptors produced underscores the potential of the system to generate further bioactivity assays. It should, thus, facilitate the processes of finding novel therapeutically relevant molecules interfering with various receptor ligand interactions.

Preceding to this, novel insight in the signal transduction of the TSLP receptor and its activation of target genes was obtained. The findings confirm the complexity of induced intracellular processes and involved signaling pathways and thereby strengthen the view of TSLP as a key player in asthmatic inflammatory diseases.

For the interaction with TSLP and its receptor two approaches were pursued. By establishing a reporter gene based read-out the inhibitory potential of the antibody 1E10 directed against the TSLP α chain was confirmed by its ability to block activation of a TSLP target gene promoter (Ox40 ligand). By site-directed mutagenesis of the TSLP amino acid sequence a mutated variant was produced that features strongly reduced activity. Based on these results combined with recently published findings on the structure of TSLP and its receptor, a concept is introduced in this thesis how to generate antagonistic variants of TSLP with the potential to influence TSLP induced allergic and asthmatic inflammatory diseases.

Literaturverzeichnis

- [1] T Akamatsu, N Watanabe, M Kido, K Saga, J Tanaka, K Kuzushima, A Nishio, and T Chiba. Human tslp directly enhances expansion of cd8+ t cells. *Clin Exp Immunol*, 154(1):98–106, 2008.
- [2] R. J. Akhurst and A. Hata. Targeting the tgf- β signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov*, 11(10):790–811, 2012.
- [3] A Al-Shami, R Spolski, J Kelly, T Fry, PL Schwartzberg, A Pandey, CL Mackall, and WJ Leonard. A role for thymic stromal lymphopoietin in cd4(+) t cell development. *J Exp Med*, 200(2):159–68, 2004.
- [4] A Al-Shami, R Spolski, J Kelly, A Keane-Myers, and WJ Leonard. A role for tslp in the development of inflammation in an asthma model. *J Exp Med*, 202(6):829–39, 2005.
- [5] Z Allakhverdi, MR Comeau, HK Jessup, BR Yoon, A Brewer, S Chartier, N Paquette, SF Ziegler, M Sarfati, and G Delespesse. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J Exp Med*, 204(2):253–8, 2007.
- [6] J. Andrae, R. Gallini, and C. Betsholtz. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*, 22(10):1276–312, 2008.
- [7] P. Angkasekwinai, H. Park, Y. H. Wang, S. H. Chang, D. B. Corry, Y. J. Liu, Z. Zhu, and C. Dong. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J Exp Med*, 204(7):1509–17, 2007.
- [8] K Arima, N Watanabe, S Hanabuchi, M Chang, SC Sun, and YJ Liu. Distinct signal codes generate dendritic cell functional plasticity. *Sci Signal*, 3(105):ra4, 2010.
- [9] M. Atanasova and A. Whitty. Understanding cytokine and growth factor receptor activation mechanisms. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 47(6):502–30, 2012.
- [10] L. Attisano, J. L. Wrana, F. Lopez-Casillas, and J. Massague. Tgf-beta receptors and actions. *Biochim Biophys Acta*, 1222(1):71–80, 1994.
- [11] K. R. Bartemes and H. Kita. Dynamic role of epithelium-derived cytokines in asthma. *Clin Immunol*, 143(3):222–235, Jun 2012.
- [12] J Behrends. Funktionelle expression und untersuchung des humanen interleukin-13 rezeptors in murinen lymphozyten. Master’s thesis, Universität Oldenburg, 2003.

- [13] B. D. Bell, M. Kitajima, R. P. Larson, T. A. Stoklasek, K. Dang, K. Sakamoto, K. U. Wagner, B. Reizis, L. Hennighausen, and S. F. Ziegler. The transcription factor stat5 is critical in dendritic cells for the development of th2 but not th1 responses. *Nat Immunol*, 14(4):364–71, 2013.
- [14] A. G. Besnard, D. Togbe, N. Guillou, F. Erard, V. Quesniaux, and B. Ryffel. Il-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol*, 41(6):1675–86, 2011.
- [15] B. Bleck, D. B. Tse, T. Gordon, M. R. Ahsan, and J. Reibman. Diesel exhaust particle-treated human bronchial epithelial cells upregulate jagged-1 and ox40 ligand in myeloid dendritic cells via thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol*, 185(11):6636–45, 2010.
- [16] S. I. Bogiatzi, I. Fernandez, J. C. Bichet, M. A. Marloie-Provost, E. Volpe, X. Sastre, and V. Soumelis. Cutting edge: Proinflammatory and th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. *J Immunol*, 178(6):3373–7, 2007.
- [17] A. Borowski, T. Vetter, M. Kuepper, A. Wohlmann, S. Krause, T. Lorenzen, J. C. Virchow, W. Luttmann, and K. Friedrich. Expression analysis and specific blockade of the receptor for human thymic stromal lymphopoietin (tslp) by novel antibodies to the human tslp α receptor chain. *Cytokine*, 61(2):546–55, 2013.
- [18] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254, May 1976.
- [19] A. Brandelius, Y. Yudina, J. Calven, L. Bjermer, M. Andersson, C. Persson, and L. Uller. dsrna-induced expression of thymic stromal lymphopoietin (tslp) in asthmatic epithelial cells is inhibited by a small airway relaxant. *Pulm Pharmacol Ther*, 24(1):59–66, 2011.
- [20] R. J. Brown, J. J. Adams, R. A. Pelekanos, Y. Wan, W. J. McKinstry, K. Palethorpe, R. M. Seeber, T. A. Monks, K. A. Eidne, M. W. Parker, and M. J. Waters. Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. *Nat Struct Mol Biol*, 12(9):814–21, 2005.
- [21] W. Busse, J. Corren, B. Q. Lanier, M. McAlary, A. Fowler-Taylor, G. D. Cioppa, A. van As, and N. Gupta. Omalizumab, anti-ige recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 108(2):184–90, 2001.
- [22] G. Cario, M. Zimmermann, R. Romey, S. Gesk, I. Vater, J. Harbott, A. Schrauder, A. Moericke, S. Izraeli, T. Akasaka, M. J. Dyer, R. Siebert, M. Schrappe, and M. Stanulla. Presence of the p2ry8-crlf2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor b-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the all-bfm 2000 protocol. *Blood*, 115(26):5393–7, 2010.

-
- [23] M. C. Catley, J. Coote, M. Bari, and K. L. Tomlinson. Monoclonal antibodies for the treatment of asthma. *Pharmacol Ther*, 132(3):333–51, 2011.
- [24] T. W. Chang. The pharmacological basis of anti-ige therapy. *Nat Biotechnol*, 18(2):157–62, 2000.
- [25] E Chapiro, L Russell, E Lainey, S Kaltenbach, C Ragu, V Della-Valle, K Hanssens, EA Macintyre, I Radford-Weiss, E Delabesse, H Cave, T Mercher, CJ Harrison, F Nguyen-Khac, P Dubreuil, and OA Bernard. Activating mutation in the tslpr gene in b-cell precursor lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 24(3):642–5, 2010.
- [26] P. Chaturvedi, M. V. Reddy, and E. P. Reddy. Src kinases and not jaks activate stats during il-3 induced myeloid cell proliferation. *Oncogene*, 16(13):1749–58, 1998.
- [27] Z. G. Chen, T. T. Zhang, H. T. Li, F. H. Chen, X. L. Zou, J. Z. Ji, and H. Chen. Neutralization of tslp inhibits airway remodeling in a murine model of allergic asthma induced by chronic exposure to house dust mite. *PLoS One*, 8(1):e51268, 2013.
- [28] J. Y. Chow, C. K. Wong, P. F. Cheung, and C. W. Lam. Intracellular signaling mechanisms regulating the activation of human eosinophils by the novel th2 cytokine il-33: implications for allergic inflammation. *Cell Mol Immunol*, 7(1):26–34, 2010.
- [29] D. K. Chu, A. Llop-Guevara, T. D. Walker, K. Flader, S. Goncharova, J. E. Boudreau, C. L. Moore, T. Seunghyun In, S. Wasserman, A. J. Coyle, R. Kolbeck, A. A. Humbles, and M. Jordana. Il-33, but not thymic stromal lymphopoietin or il-25, is central to mite and peanut allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol*, 131(1):187–200.e1–8, 2013.
- [30] S. N. Constantinescu, L. J. Huang, H. Nam, and H. F. Lodish. The erythropoietin receptor cytosolic juxtamembrane domain contains an essential, precisely oriented, hydrophobic motif. *Mol Cell*, 7(2):377–85, 2001.
- [31] C. J. Corrigan, W. Wang, Q. Meng, C. Fang, G. Eid, M. R. Caballero, Z. Lv, Y. An, Y. H. Wang, Y. J. Liu, A. B. Kay, T. H. Lee, and S. Ying. Allergen-induced expression of il-25 and il-25 receptor in atopic asthmatic airways and late-phase cutaneous responses. *J Allergy Clin Immunol*, 128(1):116–24, 2011.
- [32] L. Cosenza, A. Rosenbach, J. V. White, J. R. Murphy, and T. Smith. Comparative model building of interleukin-7 using interleukin-4 as a template: a structural hypothesis that displays atypical surface chemistry in helix d important for receptor activation. *Protein Sci*, 9(5):916–26, 2000.
- [33] A Cramer, S Kleiner, M Westermann, A Meissner, A Lange, and K Friedrich. Activation of the c-met receptor complex in fibroblasts drives invasive cell behavior by signaling through transcription factor stat3. *J Cell Biochem*, 95(4):805–16, 2005.
- [34] L. De Monte, M. Reni, E. Tassi, D. Clavenna, I. Papa, H. Recalde, M. Braga, V. Di Carlo, C. Doglioni, and M. P. Protti. Intratumor t helper type 2 cell infiltrate correlates

- with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med*, 2011.
- [35] S. Demehri, M. Morimoto, M. J. Holtzman, and R. Kopan. Skin-derived tslp triggers progression from epidermal-barrier defects to asthma. *PLoS Biol*, 7(5):e1000067, 2009.
- [36] S. Demehri, A. Turkoz, S. Manivasagam, L. J. Yockey, M. Turkoz, and R. Kopan. Elevated epidermal thymic stromal lymphopoietin levels establish an antitumor environment in the skin. *Cancer Cell*, 22(4):494–505, 2012.
- [37] M. Di Piazza, C. S. Nowell, U. Koch, A. D. Durham, and F. Radtke. Loss of cutaneous tslp-dependent immune responses skews the balance of inflammation from tumor protective to tumor promoting. *Cancer Cell*, 22(4):479–93, 2012.
- [38] M. J. Edwards. Therapy directed against thymic stromal lymphopoietin. *Drug News Perspect*, 21(6):312–6, 2008.
- [39] E. Elkord, P. E. Williams, H. Kynaston, and A. W. Rowbottom. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. *Immunology*, 114(2):204–12, 2005.
- [40] René Eulendorf, Anna Dittrich, Christina Khouri, Pia J. Müller, Barbara Mütze, Alexandra Wolf, and Fred Schaper. Interleukin-6 signalling: more than jaks and stats. *Eur J Cell Biol*, 91(6-7):486–495, 2012.
- [41] M. R. Facci, G. Auray, R. Buchanan, J. van Kessel, D. R. Thompson, S. Mackenzie-Dyck, L. A. Babiuk, and V. Gerdt. A comparison between isolated blood dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells in pigs. *Immunology*, 129(3):396–405, 2010.
- [42] D. Farre, R. Roset, M. Huerta, J. E. Adsua, L. Rosello, M. M. Alba, and X. Messeguer. Identification of patterns in biological sequences at the alggen server- promo and malgen. *Nucleic Acids Res*, 31(13):3651–3, 2003.
- [43] SL Friend, S Hosier, A Nelson, D Foxworthe, DE Williams, and A Farr. A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface igm+ b cells and produces a novel growth factor affecting b and t lineage cells. *Exp Hematol*, 22(3):321–8, 1994.
- [44] K. Fujio, T. Nosaka, T. Kojima, T. Kawashima, T. Yahata, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, K. Yamamoto, T. Nishimura, and T. Kitamura. Molecular cloning of a novel type 1 cytokine receptor similar to the common gamma chain. *Blood*, 95(7):2204–10, 2000.
- [45] R. W. Ganster, Z. Guo, L. Shao, and D. A. Geller. Differential effects of tnf-alpha and ifn-gamma on gene transcription mediated by nf-kappab-stat1 interactions. *J Interferon Cytokine Res*, 25(11):707–19, 2005.
- [46] M Gilliet, V Soumelis, N Watanabe, S Hanabuchi, S Antonenko, R de Waal-Malefyt, and YJ Liu. Human dendritic cells activated by tslp and cd40l induce proallergic cytotoxic t cells. *J Exp Med*, 197(8):1059–63, 2003.

-
- [47] JS Greiser, C Stross, PC Heinrich, I Behrmann, and HM Hermanns. Orientational constraints of the gp130 intracellular juxtamembrane domain for signaling. *J Biol Chem*, 277(30):26959–65, 2002.
- [48] Q. Gu, Y. Kong, Z. B. Yu, L. Bai, and Y. B. Xiao. Hypoxia-induced socs3 is limiting stat3 phosphorylation and nf- κ b activation in congenital heart disease. *Biochimie*, 93(5): 909–20, 2011.
- [49] RC Harvey, CG Mullighan, IM Chen, W Wharton, FM Mikhail, AJ Carroll, H Kang, W Liu, KK Dobbin, MA Smith, WL Carroll, M Devidas, WP Bowman, BM Camitta, GH Reaman, SP Hunger, JR Downing, and CL Willman. Rearrangement of *crlf2* is associated with mutation of jak kinases, alteration of *ikzf1*, hispanic/latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric b-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 115(26): 5312–21, 2010.
- [50] M. B. Headley, B. Zhou, W. X. Shih, T. Aye, M. R. Comeau, and S. F. Ziegler. Tslp conditions the lung immune environment for the generation of pathogenic innate and antigen-specific adaptive immune responses. *J Immunol*, 182(3):1641–7, 2009.
- [51] T. Heinemeyer, E. Wingender, I. Reuter, H. Hermjakob, A. E. Kel, O. V. Kel, E. V. Ignatieva, E. A. Ananko, O. A. Podkolodnaya, F. A. Kolpakov, N. L. Podkolodny, and N. A. Kolchanov. Databases on transcriptional regulation: Transfac, trrd and compel. *Nucleic Acids Res*, 26(1):362–7, 1998.
- [52] L. Hertzberg, E. Vendramini, I. Ganmore, G. Cazzaniga, M. Schmitz, J. Chalker, R. Shiloh, I. Iacobucci, C. Shochat, S. Zeligson, G. Cario, M. Stanulla, S. Strehl, L. J. Russell, C. J. Harrison, B. Bornhauser, A. Yoda, G. Rechavi, D. Bercovich, A. Borkhardt, H. Kempfski, G. te Kronnie, J. P. Bourquin, E. Domany, and S. Izraeli. Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of *crlf2* is associated with mutated *jak2*: a report from the international bfm study group. *Blood*, 115(5):1006–17, 2010.
- [53] R. Hirano, S. Hasegawa, K. Hashimoto, Y. Haneda, A. Ohsaki, and T. Ichiyama. Human thymic stromal lymphopoietin enhances expression of cd80 in human cd14+ monocytes/macrophages. *Inflamm Res*, 60(6):605–10, 2011.
- [54] T. Hiroyama, A. Iwama, Y. Morita, Y. Nakamura, A. Shibuya, and H. Nakauchi. Molecular cloning and characterization of *crlm-2*, a novel type i cytokine receptor preferentially expressed in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 272(1):224–9, 2000.
- [55] C. L. Hsu, C. V. Neilsen, and P. J. Bryce. Il-33 is produced by mast cells and regulates ige-dependent inflammation. *PLoS One*, 5(8):e11944, 2010.
- [56] S. R. Hubbard and J. H. Till. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*, 69:373–98, 2000.

-
- [57] Kathryn E. Hulse, Amanda J. Reefer, Victor H. Engelhard, James T. Patrie, Steven F. Ziegler, Martin D. Chapman, and Judith A. Woodfolk. Targeting allergen to fcγmari reveals a novel t(h)2 regulatory pathway linked to thymic stromal lymphopoietin receptor. *J Allergy Clin Immunol*, 125(1):247–56.e1–8, Jan 2010.
- [58] J. N. Ihle. Cytokine receptor signalling. *Nature*, 377(6550):591–4, 1995.
- [59] DE Isaksen, H Baumann, PA Trobridge, AG Farr, SD Levin, and SF Ziegler. Requirement for stat5 in thymic stromal lymphopoietin-mediated signal transduction. *J Immunol*, 163(11):5971–7, 1999.
- [60] DE Isaksen, H Baumann, B Zhou, S Nivollet, AG Farr, SD Levin, and SF Ziegler. Uncoupling of proliferation and stat5 activation in thymic stromal lymphopoietin-mediated signal transduction. *J Immunol*, 168(7):3288–94, 2002.
- [61] T. Ito, Y. J. Liu, and K. Arima. Cellular and molecular mechanisms of tslp function in human allergic disorders—tslp programs the "th2 code" in dendritic cells. *Allergol Int*, 61(1):35–43, 2012.
- [62] T Ito, YH Wang, O Duramad, T Hori, GJ Delespesse, N Watanabe, FX Qin, Z Yao, W Cao, and YJ Liu. Tslp-activated dendritic cells induce an inflammatory t helper type 2 cell response through ox40 ligand. *J Exp Med*, 202(9):1213–23, 2005.
- [63] R. Jaster, E. Tschirch, T. Bittorf, and J. Brock. Interferon-α inhibits proliferation of ba/f3 cells by interfering with interleukin-3 action. *Cell Signal*, 11(10):769–75, 1999.
- [64] A Kato, S Jr Favoreto, PC Avila, and RP Schleimer. Tlr3- and th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J Immunol*, 179(2):1080–7, 2007.
- [65] D. Kaur and C. Brightling. Ox40/ox40 ligand interactions in t-cell regulation and asthma. *Chest*, 141(2):494–9, 2012.
- [66] M. Kitajima, H. C. Lee, T. Nakayama, and S. F. Ziegler. Tslp enhances the function of helper type 2 cells. *Eur J Immunol*, 41(7):1862–71, 2011.
- [67] U. Klammert, J. Nickel, K. Würzler, C. Klingelhöffer, W. Sebald, A. C. Kübler, and T. Reuther. Biological activity of a genetically modified bmp-2 variant with inhibitory activity. *Head Face Med*, 5:6, 2009.
- [68] H. Kouzaki, S. M. O’Grady, C. B. Lawrence, and H. Kita. Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. *J Immunol*, 183(2):1427–34, 2009.
- [69] S Krause, J Behrends, A Borowski, J Lohrmann, S Lang, D Myrtek, T Lorenzen, JC Virchow, W Luttmann, and K Friedrich. Blockade of interleukin-13-mediated cell activation by a novel inhibitory antibody to human il-13 receptor α1. *Mol Immunol*, 43(11):1799–807, 2006.

- [70] S. Krause, D. Würdemann, A. Wentzel, A. Christmann, H. Fehr, H. Kolmar, and K. Friedrich. Bacteria displaying interleukin-4 mutants stimulate mammalian cells and reflect the biological activities of variant soluble cytokines. *Chembiochem*, 5(6):804–10, 2004.
- [71] T. E. Kreis. Microinjected antibodies against the cytoplasmic domain of vesicular stomatitis virus glycoprotein block its transport to the cell surface. *EMBO J*, 5(5):931–41, 1986.
- [72] N. Kruse, B. J. Shen, S. Arnold, H. P. Tony, T. Müller, and W. Sebald. Two distinct functional sites of human interleukin 4 are identified by variants impaired in either receptor binding or receptor activation. *EMBO J*, 12(13):5121–9, 1993.
- [73] N. Kruse, H. P. Tony, and W. Sebald. Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement. *EMBO J*, 11(9):3237–44, 1992.
- [74] Y. Laouar, T. Welte, X. Y. Fu, and R. A. Flavell. Stat3 is required for flt3l-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity*, 19(6):903–12, 2003.
- [75] K Larsson, M Lindstedt, and CA Borrebaeck. Functional and transcriptional profiling of mutz-3, a myeloid cell line acting as a model for dendritic cells. *Immunology*, 117(2): 156–66, 2006.
- [76] T. A. Le, T. Takai, A. T. Vu, H. Kinoshita, S. Ikeda, H. Ogawa, and K. Okumura. Glucocorticoids inhibit double-stranded rna-induced thymic stromal lymphopoietin release from keratinocytes in an atopic cytokine milieu more effectively than tacrolimus. *Int Arch Allergy Immunol*, 153(1):27–34, 2010.
- [77] H. C. Lee, M. B. Headley, Y. M. Loo, A. Berlin, M. Gale, J. S. Debley, N. W. Lukacs, and S. F. Ziegler. Thymic stromal lymphopoietin is induced by respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells and promotes a type 2 response to infection. *J Allergy Clin Immunol*, 130(5):1187–1196.e5, 2012.
- [78] H. C. Lee and S. F. Ziegler. Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by nfkapab. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(3):914–9, 2007.
- [79] WJ Leonard. Tslp: finally in the limelight. *Nat Immunol*, 3(7):605–7, 2002.
- [80] WJ Leonard and JJ O’Shea. Jaks and stats: biological implications. *Annu Rev Immunol*, 16:293–322, 1998.
- [81] SD Levin, RM Koelling, SL Friend, DE Isaksen, SF Ziegler, RM Perlmutter, and AG Farr. Thymic stromal lymphopoietin: a cytokine that promotes the development of igm+ b cells in vitro and signals via a novel mechanism. *J Immunol*, 162(2):677–83, 1999.

-
- [82] J. M. Leyva-Castillo, P. Hener, H. Jiang, and M. Li. Tslp produced by keratinocytes promotes allergen sensitization through skin and thereby triggers atopic march in mice. *J Invest Dermatol*, 133(1):154–63, 2013.
- [83] D. Q. Li, L. Zhang, S. C. Pflugfelder, C. S. De Paiva, X. Zhang, G. Zhao, X. Zheng, Z. Su, and Y. Qu. Short ragweed pollen triggers allergic inflammation through toll-like receptor 4-dependent thymic stromal lymphopoietin/ox40 ligand/ox40 signaling pathways. *J Allergy Clin Immunol*, 128(6):1318–1325.e2, 2011.
- [84] H. S. Li and S. S. Watowich. Diversification of dendritic cell subsets: Emerging roles for stat proteins. *JAKSTAT*, 2(4):e25112, 2013.
- [85] X. Li, X. Han, S. Wang, and Z. Duan. Development and characterization of monoclonal antibodies against mouse tslp. *Hybridoma (Larchmt)*, 29(5):425–30, 2010.
- [86] A. B. Madhankumar, Akiva Mintz, and Waldemar Debinski. Interleukin 13 mutants of enhanced avidity toward the glioma-associated receptor, il13ralpha2. *Neoplasia*, 6(1):15–22, 2004.
- [87] I. Mahmutovic-Persson, M. Johansson, A. Brandelius, J. Calven, L. Bjermer, Y. Yudina, and L. Uller. Capacity of capsazepinoids to relax human small airways and inhibit tlr3-induced tslp and ifngamma production in diseased bronchial epithelial cells. *Int Immunopharmacol*, 13(3):292–300, 2012.
- [88] J. Massague. Receptors for the tgf-beta family. *Cell*, 69(7):1067–70, 1992.
- [89] J. Massague. Tgf-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67:753–91, 1998.
- [90] AJ Masterson, CC Sombroek, TD De Gruijl, YM Graus, HJ van der Vliet, SM Lougheed, AJ van den Eertwegh, HM Pinedo, and RJ Scheper. Mutz-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from cd34+ precursors. *Blood*, 100(2):701–3, 2002.
- [91] C. A. McElroy, J. A. Dohm, and S. T. Walsh. Structural and biophysical studies of the human il-7/il-7ralpha complex. *Structure*, 17(1):54–65, 2009.
- [92] X. Messeguer, R. Escudero, D. Farre, O. Nunez, J. Martinez, and M. M. Alba. Promodetection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*, 18(2):333–4, 2002.
- [93] B. Messner, A. M. St"ütz, B. Albrecht, S. Peiritsch, and M. Woisetschl"ager. Cooperation of binding sites for stat6 and nf kappa b/rel in the il-4-induced up-regulation of the human ige germline promoter. *J Immunol*, 159(7):3330–7, 1997.
- [94] G. A. Millot, W. Vainchenker, D. Dumenil, and F. Svinarchuk. Differential signalling of nh2-terminal flag-labelled thrombopoietin receptor activated by tpo or anti-flag antibodies. *Cell Signal*, 16(3):355–63, 2004.

- [95] M. Miyata, Y. Nakamura, N. Shimokawa, Y. Ohnuma, R. Katoh, S. Matsuoka, K. Okumura, H. Ogawa, K. Masuyama, and A. Nakao. Thymic stromal lymphopoietin is a critical mediator of il-13-driven allergic inflammation. *Eur J Immunol*, 39(11):3078–83, 2009.
- [96] R Moriggl, V Gouilleux-Gruart, R Jähne, S Berchtold, C Gartmann, X Liu, L Hennighausen, A Sotiropoulos, B Groner, and F Gouilleux. Deletion of the carboxyl-terminal transactivation domain of mgf-stat5 results in sustained dna binding and a dominant negative phenotype. *Mol Cell Biol*, 16(10):5691–700, 1996.
- [97] CG Mullighan, JR Collins-Underwood, LA Phillips, MG Loudin, W Liu, J Zhang, J Ma, E Coustan-Smith, RC Harvey, CL Willman, FM Mikhail, J Meyer, AJ Carroll, RT Williams, J Cheng, NA Heerema, G Basso, A Pession, CH Pui, SC Raimondi, SP Hunger, JR Downing, WL Carroll, and KR Rabin. Rearrangement of *crlf2* in b-progenitor- and down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 41(11):1243–6, 2009.
- [98] T. Musikacharoen, T. Matsuguchi, T. Kikuchi, and Y. Yoshikai. Nf-kappa b and stat5 play important roles in the regulation of mouse toll-like receptor 2 gene expression. *J Immunol*, 166(7):4516–24, 2001.
- [99] T. Nakahara, Y. Moroi, H. Uchi, and M. Furue. Differential role of mapk signaling in human dendritic cell maturation and th1/th2 engagement. *J Dermatol Sci*, 42(1):1–11, 2006.
- [100] K. Nishikubo, Y. Murata, S. Tamaki, K. Sugama, K. Imanaka-Yoshida, N. Yuda, M. Kai, S. Takamura, W. Sebald, Y. Adachi, and Y. Yasutomi. A single administration of interleukin-4 antagonistic mutant dna inhibits allergic airway inflammation in a mouse model of asthma. *Gene Ther*, 10(26):2119–25, 2003.
- [101] A. Noble and D. M. Kemeny. Interleukin-4 enhances interferon-gamma synthesis but inhibits development of interferon-gamma-producing cells. *Immunology*, 85(3):357–63, 1995.
- [102] H. Ogiso, R. Ishitani, O. Nureki, S. Fukai, M. Yamanaka, J. H. Kim, K. Saito, A. Sakamoto, M. Inoue, M. Shirouzu, and S. Yokoyama. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*, 110(6):775–87, 2002.
- [103] H. Ohashi, K. Maruyama, Y. C. Liu, and A. Yoshimura. Ligand-induced activation of chimeric receptors between the erythropoietin receptor and receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(1):158–62, 1994.
- [104] Y. Ohmori, R. D. Schreiber, and T. A. Hamilton. Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappa b. *J Biol Chem*, 272(23):14899–907, 1997.

- [105] P. B. Olkhanud, Y. Rochman, M. Bodogai, E. Malchinkhuu, K. Wejksza, M. Xu, R. E. Gress, C. Hesdorffer, W. J. Leonard, and A. Biragyn. Thymic stromal lymphopoietin is a key mediator of breast cancer progression. *J Immunol*, 186(10):5656–62, 2011.
- [106] M Omori and S Ziegler. Induction of il-4 expression in cd4(+) t cells by thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol*, 178(3):1396–404, 2007.
- [107] R. Palacios and M. Steinmetz. Il-3-dependent mouse clones that express b-220 surface antigen, contain ig genes in germ-line configuration, and generate b lymphocytes in vivo. *Cell*, 41(3):727–34, 1985.
- [108] A Pandey, K Ozaki, H Baumann, SD Levin, A Puel, AG Farr, SF Ziegler, WJ Leonard, and HF Lodish. Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. *Nat Immunol*, 1(1):59–64, 2000.
- [109] LS Park, U Martin, K Garka, B Gliniak, JP Di Santo, W Muller, DA Largaespada, NG Copeland, NA Jenkins, AG Farr, SF Ziegler, PJ Morrissey, R Paxton, and JE Sims. Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (tslp) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *J Exp Med*, 192(5):659–70, 2000.
- [110] A. Pedroza-Gonzalez, K. Xu, T. C. Wu, C. Aspod, S. Tindle, F. Marches, M. Gallegos, E. C. Burton, D. Savino, T. Hori, Y. Tanaka, S. Zurawski, G. Zurawski, L. Bover, Y. J. Liu, J. Banchemreau, and A. K. Palucka. Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation. *J Exp Med*, 2011.
- [111] K. L. Pierce, R. T. Premont, and R. J. Lefkowitz. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(9):639–50, 2002.
- [112] D. Prefontaine, J. Nadigel, F. Chouiali, S. Audusseau, A. Semlali, J. Chakir, J. G. Martin, and Q. Hamid. Increased il-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 125(3):752–4, 2010.
- [113] P. N. Pushparaj, H. K. Tay, S. C. H’ng, N. Pitman, D. Xu, A. McKenzie, F. Y. Liew, and A. J. Melendez. The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(24):9773–8, 2009.
- [114] H Quentmeier, HG Drexler, D Fleckenstein, M Zaborski, A Armstrong, JE Sims, and SD Lyman. Cloning of human thymic stromal lymphopoietin (tslp) and signaling mechanisms leading to proliferation. *Leukemia*, 15(8):1286–92, 2001.
- [115] T. Rabilloud, G. Carpentier, and P. Tarroux. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis*, 9(6):288–91, 1988.

-
- [116] RJ Ray, C Furlonger, DE Williams, and CJ Paige. Characterization of thymic stromal-derived lymphopoietin (tslp) in murine b cell development in vitro. *Eur J Immunol*, 26(1):10–6, 1996.
- [117] PA Reche, V Soumelis, DM Gorman, T Clifford, Liu Mr, M Travis, SM Zurawski, J Johnston, YJ Liu, H Spits, R de Waal Malefyt, RA Kastelein, and JF Bazan. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol*, 167(1): 336–43, 2001.
- [118] N. S. Redhu and A. S. Gounni. Function and mechanisms of tslp/tslpr complex in asthma and copd. *Clin Exp Allergy*, 42(7):994–1005, 2011.
- [119] N. S. Redhu, L. Shan, H. Movassagh, and A. S. Gounni. Thymic stromal lymphopoietin induces migration in human airway smooth muscle cells. *Sci Rep*, 3:2301, 2013.
- [120] Y. Riffo-Vasquez and D. Spina. Role of cytokines and chemokines in bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation. *Pharmacol Ther*, 94(3):185–211, 2002.
- [121] I Rochman, N Watanabe, K Arima, YJ Liu, and WJ Leonard. Cutting edge: direct action of thymic stromal lymphopoietin on activated human cd4+ t cells. *J Immunol*, 178(11): 6720–4, 2007.
- [122] Y. Rochman, M. Kashyap, G. W. Robinson, K. Sakamoto, J. Gomez-Rodriguez, K. U. Wagner, and W. J. Leonard. Thymic stromal lymphopoietin-mediated stat5 phosphorylation via kinases jak1 and jak2 reveals a key difference from il-7-induced signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(45):19455–60, 2010.
- [123] LJ Russell, M Capasso, I Vater, T Akasaka, OA Bernard, MJ Calasanz, T Chandrasekaran, E Chapiro, S Gesk, M Griffiths, DS Guttery, C Haferlach, L Harder, O Heidenreich, J Irving, L Kearney, F Nguyen-Khac, L Machado, L Minto, A Majid, AV Moorman, H Morrison, V Rand, JC Strefford, C Schwab, H Tönnies, MJ Dyer, R Siebert, and CJ Harrison. Deregulated expression of cytokine receptor gene, *crf2*, is involved in lymphoid transformation in b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 114 (13):2688–98, 2009.
- [124] J. Schmitz, A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T. K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, D. M. Gorman, J. F. Bazan, and R. A. Kastelein. Il-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the il-1 receptor-related protein st2 and induces t helper type 2-associated cytokines. *Immunity*, 23(5):479–90, 2005.
- [125] D. Schwache and G. Müller-Newen. Receptor fusion proteins for the inhibition of cytokines. *Eur J Cell Biol*, 91(6-7):428–34, 2012.
- [126] K Sebastian. Funktionelle rekonstitution des thymic stromal lymphopoeitin rezeptors und untersuchung zu seiner signaltransduktion. Master’s thesis, Friedrich-Schiller-Universität, Medizinische Fakultät, Institut für Biochemie II, 2008.

-
- [127] K. Seedorf, S. Felder, B. Millauer, J. Schlessinger, and A. Ullrich. Analysis of platelet-derived growth factor receptor domain function using a novel chimeric receptor approach. *J Biol Chem*, 266(19):12424–31, 1991.
- [128] D. Seshasayee, W. P. Lee, M. Zhou, J. Shu, E. Suto, J. Zhang, L. Diehl, C. D. Austin, Y. G. Meng, M. Tan, S. L. Bullens, S. Seeber, M. E. Fuentes, A. F. Labrijn, Y. M. Graus, L. A. Miller, E. S. Schelegle, D. M. Hyde, L. C. Wu, S. G. Hymowitz, and F. Martin. In vivo blockade of ox40 ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation. *J Clin Invest*, 117(12):3868–78, 2007.
- [129] L. Shan, N. S. Redhu, A. Saleh, A. J. Halayko, J. Chakir, and A. S. Gounni. Thymic stromal lymphopoietin receptor-mediated il-6 and cc/cxc chemokines expression in human airway smooth muscle cells: role of mapks (erk1/2, p38, and jnk) and stat3 pathways. *J Immunol*, 184(12):7134–43, 2010.
- [130] C. H. Shen and J. Stavnezer. Interaction of stat6 and nf-kappab: direct association and synergistic activation of interleukin-4-induced transcription. *Mol Cell Biol*, 18(6):3395–404, 1998.
- [131] L. Shi, S. W. Leu, F. Xu, X. Zhou, H. Yin, L. Cai, and L. Zhang. Local blockade of tslp receptor alleviated allergic disease by regulating airway dendritic cells. *Clin Immunol*, 129(2):202–10, 2008.
- [132] J. E. Sims, D. E. Williams, P. J. Morrissey, K. Garka, D. Foxworthe, V. Price, S. L. Friend, A. Farr, M. A. Bedell, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, K. Grabstein, and R. J. Paxton. Molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor. *J Exp Med*, 192(5):671–80, 2000.
- [133] D. F. Smelter, V. Sathish, M. A. Thompson, C. M. Pabelick, R. Vassallo, and Y. S. Prakash. Thymic stromal lymphopoietin in cigarette smoke-exposed human airway smooth muscle. *J Immunol*, 185(5):3035–40, 2010.
- [134] V Soumelis, PA Reche, H Kanzler, W Yuan, G Edward, B Homey, M Gilliet, S Ho, S Antonenko, A Lauerma, K Smith, D Gorman, S Zurawski, J Abrams, S Menon, T McClanahan, R de Waal-Malefyt Rd, F Bazan, RA Kastelein, and YJ Liu. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing tslp. *Nat Immunol*, 3(7):673–80, 2002.
- [135] J. Staerk, J. P. Defour, C. Pecquet, E. Leroy, H. Antoine-Poirel, I. Brett, M. Itaya, S. O. Smith, W. Vainchenker, and S. N. Constantinescu. Orientation-specific signalling by thrombopoietin receptor dimers. *EMBO J*, 30(21):4398–413, 2011.
- [136] Z. Su, J. Lin, F. Lu, X. Zhang, L. Zhang, N. B. Gandhi, C. S. de Paiva, S. C. Pflugfelder, and D-Q. Li. Potential autocrine regulation of interleukin-33/st2 signaling of dendritic cells in allergic inflammation. *Mucosal Immunol*, 6(5):921–930, Sep 2013.

- [137] T. Taga and T. Kishimoto. Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB J*, 6(15):3387–96, 1992.
- [138] J. W. Tanner, W. Chen, R. L. Young, G. D. Longmore, and A. S. Shaw. The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with jak kinases. *J Biol Chem*, 270(12):6523–30, 1995.
- [139] S. K. Tasian, M. Y. Doral, M. J. Borowitz, B. L. Wood, I. M. Chen, R. C. Harvey, J. M. Gastier-Foster, C. L. Willman, S. P. Hunger, C. G. Mullighan, and M. L. Loh. Aberrant stat5 and pi3k/mTOR pathway signaling occurs in human crlf2-rearranged b-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 120(4):833–42, 2012.
- [140] JE Thompson, RM Cubbon, RT Cummings, LS Wicker, R Frankshun, BR Cunningham, PM Cameron, PT Meinke, N Liverton, Y Weng, and JA DeMartino. Photochemical preparation of a pyridone containing tetracycle: a jak protein kinase inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*, 12(8):1219–23, 2002.
- [141] Y Tono-zuka, K Fujio, T Sugiyama, T Nosaka, M Hirai, and T Kitamura. Molecular cloning of a human novel type i cytokine receptor related to delta1/tslpr. *Cytogenet Cell Genet*, 93(1-2):23–5, 2001.
- [142] H. P. Tony, B. J. Shen, P. Reusch, and W. Sebald. Design of human interleukin-4 antagonists inhibiting interleukin-4-dependent and interleukin-13-dependent responses in t-cells and b-cells with high efficiency. *Eur J Biochem*, 225(2):659–65, 1994.
- [143] D. van Bodegom, J. Zhong, N. Kopp, C. Dutta, M. S. Kim, L. Bird, O. Weigert, J. Tyner, A. Pandey, A. Yoda, and D. M. Weinstock. Differences in signaling through the b-cell leukemia oncoprotein crlf2 in response to tslp and through mutant jak2. *Blood*, 120(14):2853–63, 2012.
- [144] J. C. vanderSpek, J. A. Sutherland, B. M. Gill, G. Gorgun, F. M. Foss, and J. R. Murphy. Structure function analysis of interleukin 7: requirement for an aromatic ring at position 143 of helix d. *Cytokine*, 17(5):227–33, 2002.
- [145] K. Verstraete, L. van Schie, L. Vyncke, Y. Bloch, J. Tavernier, E. Pauwels, F. Peelman, and S. N. Savvides. Structural basis of the proinflammatory signaling complex mediated by tslp. *Nat Struct Mol Biol*, 2014.
- [146] T. Vetter. *Einsatz funktioneller Antikörper zur Detektion und Hemmung des malignitätsassoziierten Rezeptors für Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) bei akuter lymphatischer Leukämie der B-Zellen (B-ALL)*. PhD thesis, Friedrich-Schiller-Universität, Medizinische Fakultät, 2013.
- [147] A. T. Vu, T. Baba, X. Chen, T. A. Le, H. Kinoshita, Y. Xie, S. Kamijo, K. Hiramatsu, S. Ikeda, H. Ogawa, K. Okumura, and T. Takai. Staphylococcus aureus membrane and diacylated lipopeptide induce thymic stromal lymphopoietin in keratinocytes through the

- toll-like receptor 2-toll-like receptor 6 pathway. *J Allergy Clin Immunol*, 126(5):985–93, 993.e1–3, 2010.
- [148] Y. H. Wang and Y. J. Liu. Thymic stromal lymphopoietin, ox40-ligand, and interleukin-25 in allergic responses. *Clin Exp Allergy*, 39(6):798–806, 2009.
- [149] N Watanabe, S Hanabuchi, V Soumelis, W Yuan, S Ho, R de Waal Malefyt, and YJ Liu. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated cd4+ t cell homeostatic expansion. *Nat Immunol*, 5(4):426–34, 2004.
- [150] S. Wenzel, D. Wilbraham, R. Fuller, E. B. Getz, and M. Longphre. Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies. *Lancet*, 370(9596):1422–31, 2007.
- [151] C. M. Williams, S. Rahman, C. Hubeau, and H. L. Ma. Cytokine pathways in allergic disease. *Toxicol Pathol*, 40(2):205–15, 2012.
- [152] A Wohlmann, K Sebastian, A Borowski, S Krause, and K Friedrich. Signal transduction by the atopy-associated human thymic stromal lymphopoietin (tslp) receptor depends on janus kinase function. *Biol Chem*, 391(2-3):181–6, 2010.
- [153] C. K. Wong, S. Hu, P. F. Cheung, and C. W. Lam. Thymic stromal lymphopoietin induces chemotactic and prosurvival effects in eosinophils: implications in allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 43(3):305–15, 2010.
- [154] K. V. Wood, J. R. de Wet, N. Dewji, and M. DeLuca. Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of rna obtained from adult lanterns. *Biochem Biophys Res Commun*, 124(2):592–596, Oct 1984.
- [155] Y Yamashita, S Watanabe, A Miyazato, K Ohya, U Ikeda, K Shimada, N Komatsu, K Hatake, Y Miura, K Ozawa, and H Mano. Tec and jak2 kinases cooperate to mediate cytokine-driven activation of c-fos transcription. *Blood*, 91(5):1496–507, 1998.
- [156] C. H. Yang, A. Murti, S. R. Pfeffer, J. G. Kim, D. B. Donner, and L. M. Pfeffer. Interferon alpha /beta promotes cell survival by activating nuclear factor kappa b through phosphatidylinositol 3-kinase and akt. *J Biol Chem*, 276(17):13756–61, 2001.
- [157] S Ying, B O’Connor, J Ratoff, Q Meng, K Mallett, D Cousins, D Robinson, G Zhang, J Zhao, TH Lee, and C Corrigan. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol*, 174(12):8183–90, 2005.
- [158] A Yoda, Y Yoda, S Chiaretti, M Bar-Natan, K Mani, SJ Rodig, N West, Y Xiao, JR Brown, C Mitsiades, M Sattler, JL Kutok, DJ DeAngelo, M Wadleigh, A Piciocchi, P Dal Cin, JE Bradner, JD Griffin, KC Anderson, RM Stone, J Ritz, R Foa, JC Aster, DA Frank, and DM Weinstock. Functional screening identifies crlf2 in precursor b-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(1):252–7, 2010.

-
- [159] J. Yoo, M. Omori, D. Gyarmati, B. Zhou, T. Aye, A. Brewer, M. R. Comeau, D. J. Campbell, and S. F. Ziegler. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J Exp Med*, 202(4):541–9, 2005.
- [160] A Yoshimura, M Ichihara, I Kinjyo, M Moriyama, NG Copeland, DJ Gilbert, NA Jenkins, T Hara, and A Miyajima. Mouse oncostatin m: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the jak-stat5 pathway. *EMBO J*, 15(5):1055–63, 1996.
- [161] F. Zhang, G. Huang, B. Hu, Y. Song, and Y. Shi. A soluble thymic stromal lymphopoietin (tslp) antagonist, tslpr-immunoglobulin, reduces the severity of allergic disease by regulating pulmonary dendritic cells. *Clin Exp Immunol*, 164(2):256–64, 2011.
- [162] K. Zhang, L. Shan, M. S. Rahman, H. Unruh, A. J. Halayko, and A. S. Gounni. Constitutive and inducible thymic stromal lymphopoietin expression in human airway smooth muscle cells: role in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 293(2):L375–82, 2007.
- [163] Peng Zhang, Guanmin Jiang, Jiao Gao, Lingling Li, Jun Du, and Xingyuan Jiao. Saha down-regulates the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase via inhibition of the jak/stat1 signaling pathway in gallbladder carcinoma cells. *Oncol Rep*, 29(1):269–275, Jan 2013.
- [164] W Zhang, J Wang, Q Wang, G Chen, J Zhang, T Chen, T Wan, Y Zhang, and X Cao. Identification of a novel type i cytokine receptor crl2 preferentially expressed by human dendritic cells and activated monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 281(4):878–83, 2001.
- [165] Z. Zhang, P. Hener, N. Frossard, S. Kato, D. Metzger, M. Li, and P. Chambon. Thymic stromal lymphopoietin overproduced by keratinocytes in mouse skin aggravates experimental asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(5):1536–41, 2009.
- [166] J. Zhong, M. S. Kim, R. Chaerkady, X. Wu, T. C. Huang, D. Getnet, C. J. Mitchell, S. M. Palapetta, J. Sharma, R. N. O’Meally, R. N. Cole, A. Yoda, A. Moritz, M. M. Loriaux, J. Rush, D. M. Weinstock, J. W. Tyner, and A. Pandey. Tslp signaling network revealed by silac-based phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics*, 11(6):M112.017764, 2012.
- [167] J. Zhong, X. Liu, and A. Pandey. Effects of transmembrane and juxtamembrane domains on proliferative ability of tslp receptor. *Mol Immunol*, 47(6):1207–15, 2010.
- [168] J. Zhong and A. Pandey. Site-directed mutagenesis reveals a unique requirement for tyrosine residues in il-7 α and tslpr cytoplasmic domains in tslp-dependent cell proliferation. *BMC Immunol*, 11:5, 2010.
- [169] B Zhou, MR Comeau, T De Smedt, HD Liggitt, ME Dahl, DB Lewis, D Gyarmati, T Aye, DJ Campbell, and SF Ziegler. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol*, 6(10):1047–53, 2005.

- [170] C. Zugowski, F. Lieder, A. Müller, J. Gasch, F. M. Corvinus, R. Moriggl, and K. Friedrich. Stat3 controls matrix metalloproteinase-1 expression in colon carcinoma cells by both direct and ap-1-mediated interaction with the mmp-1 promoter. *Biol Chem*, 392(5):449–59, 2011.

6 Anhang

6.1 Primer

Die für die Klonierungen verwendeten Primer sind in Tabelle 4 dargestellt. Alle Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen. Die Sequenz der Primer ist immer in 5'-3'-Richtung angegeben, unterstrichen sind die Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme. Mutationsstellen mit von der Originalsequenz abweichenden Bereichen sind in **blau** dargestellt. Zu den Referenzsequenzen komplementären Nukleotide sind in Großbuchstaben angegeben. Abkürzungen: rev - *reverse*-Primer, for - *forward*-Primer.

Tabelle 4: Verwendete Primer

Bezeichnung	Primersequenz (in 5'-3'-Richtung)	Enzym Restriktion
Rezeptorklonierungen und -Mutationen		
hTSLPR α -for	gggtccactcgagCAAGGAGGAGC	<i>XhoI</i>
hTSLPR α -rev	ggccctctagatcaTCACAACGCCACGTAG	<i>XbaI</i>
hIL7R α -for	gggtccactcgagGAAAGTGGCTATGCTC	<i>XhoI</i>
hIL7R α -rev	gggccctctagatcactaCTGGTTTTGGTAG	<i>XbaI</i>
hIL7R α -for-mutBox1	CTATCgtatggcccagctctcccgatcatAAG	
hIL7R α -rev-mutBox1	CTTatgatcggggagactgggccatacGATAG	
hTSLPR α -for-mutBox1	AattccagcgtgcccgacccgAAATCCATC	
hTSLPR α -rev-mutBox1	GATGGATTTcgggtcgggcacgctgggaatG	
hTSLPR α -rev-mutY368F	gccctctagatcaTCACAACGCCACgaaGGAGC	<i>XbaI</i>
mIL-7R α -for	gggtccactcgagGAAAGTGGAAATGCCCAGGAT	<i>XhoI</i>
mIL-7R α -rev	cgaggctgcctctagactatcaTTTGTTTTGGTAAAAACTAG	<i>XbaI</i>

mTSLPR α -for	gtccactcgagGCGGCGGCGGTGACGTCA	<i>XhoI</i>
mTSLPR α -rev	cgaggctgcctctagactatcaCAGGGTCATGTAGCCGCTGTC	<i>XbaI</i>
Klonierungen Intrazelluläre Domänen		
hIL-7R α - Int-for	gtcactcgagCCTATCTTACTAACCATCAG	<i>XhoI</i>
hIL-7R α - Int-rev	gctttctagactatcaCTGGTTTTGGTAGAAG	<i>XbaI</i>
hTSLPR α - Int-for	tcctcgagTTTATTTTAATTTCCAGCCTGGCC	<i>XhoI</i>
hTSLPR α - Int-rev	tgcttctagactaTCACAACGCCACGTAGG	<i>XbaI</i>
mIL-7R α - Int-for	tatctcgagCCTGTCTTGCCAAGTGTCAC	<i>XhoI</i>
mIL-7R α - Int-rev	aagtctagaatcATTTGTTTTGGTAAAACTAGACATGG	<i>XbaI</i>
mTSLPR α - Int-for	atactcgagCTGCCCCTGGGCTGCGGCCTAG	<i>XhoI</i>
mTSLPR α - Int-rev	tattctagactACAGGGTCATGTAGCCGCTGTCTG	<i>XbaI</i>
Klonierungen Reporterkonstrukte Ox40L-Promoter		
Ox40lProm-for- 970bp	ggcgggggtaccTGGTGTCTATTGATAGAATACC	<i>KpnI</i>
Ox40lProm-for- 800bp	ggcgggggtaccTGCTTCTTTTCTGGTATGCAG	<i>KpnI</i>
Ox40lProm-for- 700bp	ggcgggggtaccTGTCTGACACATAGTAAATG	<i>KpnI</i>
Ox40lProm-for- 600bp	ggcgggggtaccATTTTCTTGTTTTGTCTTTTTC	<i>KpnI</i>
Ox40lProm-for- 500bp	ggcgggggtaccATAAGAACCTTGGGCCAGC	<i>KpnI</i>
Ox40lProm-for- 400bp	ggcgggggtaccTATCTTTACCAAGTGAC	<i>KpnI</i>
Ox40lProm-for- 300bp	ggcgggggtaccGAATGTCACAAAAACAAC	<i>KpnI</i>

Ox40lProm-for-200bp	ggcgggggtaccCCTGCAAAAGTTGCAGCG	<i>KpnI</i>
Ox40lProm-for-100bp	ggcgggggtaccGGCTTTGTTTTGTCTTAC	<i>KpnI</i>
Ox40lProm-rev	ggcgggggctagcCTTCACAATCTGGGTAGAG	<i>NheI</i>
Klonierungen TSLP W148A rekombinant		
hTSLP-for	atatacatatgTACGATTTACCAATTGCG	<i>NdeI</i>
hTSLP-rev	gctgcagatctTTACTGCTGTTTCAGCAGTG	<i>BglII</i>
hTSLP-W148A-rev	ccagctgcagatctTTACTGCTGTTTCAGCAGTGGA CGATTAAACCGACGgcaAGCCTTGCAG	<i>BglII</i>
Klonierungen TSLP W148A Bakteriendisplay		
hTSLP-for	ctggcccggtTACGATTTACCAATTGC	<i>SmaI</i>
hTSLP-rev	cccctgagatctCTGCTGTTTCAGCAG	<i>BglII</i>
hTSLP-W148A-rev	ccctgagatctCTGCTGTTTCAGCAGTGGA CGATTAAACCGACGgcaAGCCTTGC	<i>BglII</i>
Klonierungen Hybridrezeptoren		
IL4SP-P5D4-for	CTTAAGCTTGTAACGAGCTCGGATCCATG	<i>KpnI</i>
IL4SP-P5D4-rev	gccgccggcgTGGACCCGGCTTTCCAAGACG	<i>NotI</i>
hALK5ex-for	tccagcgccgGCGGCGCTGCTCCCG	<i>NotI</i>
hALK5ex-rev	aggctcgagTTCCACAGGACCAAGGCC	<i>XhoI</i>
hTGF β RII-for	tccagcgccgACGATCCCACCGCACG	<i>NotI</i>
hTGF β RII-rev	aaactcgagGTCAGGATTGCTGGTG	<i>XhoI</i>
mc-FMSEX-for	tccagcgccgGCCCCTGTCATCGAGC	<i>NotI</i>
mc-FMSEX-rev	gtaagataggctcgagGGAATCATCGGG	<i>XhoI</i>
hPDGFR α ex-for	gtccagcgccgCAGCTTTCATTACCCTCTATC	<i>NotI</i>
hPDGFR α ex-rev	aataaactcgagTTCAGAACGCAGGGTGGGAG	<i>XhoI</i>
rIL-2R γ ex-for	gtccagcgccgTCCAAGTCTCATGTCCAG	<i>NotI</i>
rIL-2R γ ex-rev	aataaactcgagAGCTTCCAGTGCAAACAAGG	<i>XhoI</i>
rIL-4R α ex-for	gtccagcgccgATCAAGTCTGGGTGACC	<i>NotI</i>

rIL-4R α ex-rev	ataggctcgagGCGCTGCAGCAGGGGCAGCTGG	<i>XhoI</i>
Klonierung Transmembranrotation		
hTSLPR α - 1AS-for	aagccctcgagTTTATTTTA gct ATTTCCAGCCTG GCCATC	<i>XhoI</i>
hTSLPR α - 2AS-for	aagccctcgagTTTATTTTA gctgcc ATTTCCAGC CTGGCCATC	<i>XhoI</i>
hTSLPR α - 3AS-for	aagccctcgagTTTATTTTA gctgccgca ATTTCC AGCCTGGCCATC	<i>XhoI</i>
hTSLPR α - 4AS-for	aagccctcgagTTTATTTTA gctgccgcagct ATT TCCAGCCTGGCCATC	<i>XhoI</i>
hIL-7R α - 1AS-for	aagccctcgagCCTAtCTTA gct CTAACCATCAGC ATTTTG	<i>XhoI</i>
hIL-7R α - 2AS-for	aagccctcgagCCTAtCTTA gctgcc CTAACCATC AGCATTTTG	<i>XhoI</i>
hIL-7R α - 3AS-for	aagccctcgagCCTAtCTTA gctgccgca CTAACC ATCAGCATTTTG	<i>XhoI</i>
hIL-7R α - 4AS-for	aagccctcgagCCTAtCTTA gctgccgcagct CTA ACCATCAGCATTTTG	<i>XhoI</i>

6.2 DNA-Sequenzen

Die Tabelle 5 gibt die verwendeten Sequenzdaten mit ihren Einträgen aus der GenBank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) an.

Tabelle 5: Sequenzdaten aus der GenBank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Bezeichnung DNA-Abschnitt	Accession Number NCBI
hTSLPR α	NM_022148.3
hIL-7R α	NM_002185.3
mIL-7R α	NM_008372.4
mTSLPR α	NM_016715.4
Ox40-Ligand-Promoter	AB007839.1
hALK5	NM_004612.2
hTGF β RII	NM_003242.5
mc-FMS	NM_001037859.2
hPDGFR α	NM_006206.4
rIL-2R γ	NM_013563.3
rIL-4R α	NM_133380.2
hTSLP	NM_033035.4
mTSLP	NM_021367.2
eqTSLP	NM_001164063.2

6.3 Plasmidkarten

Die folgenden Plasmidkarten sind, soweit nicht die Herkunft angegeben ist, mit dem im Internet frei zugänglichen Programm APE erstellt wurden (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>). Abkürzungen: Ex - extrazelluläre Domäne, Int - intrazelluläre Domäne, luc-Luciferase, Neo-Neomycin, Tet - Tetracyclin

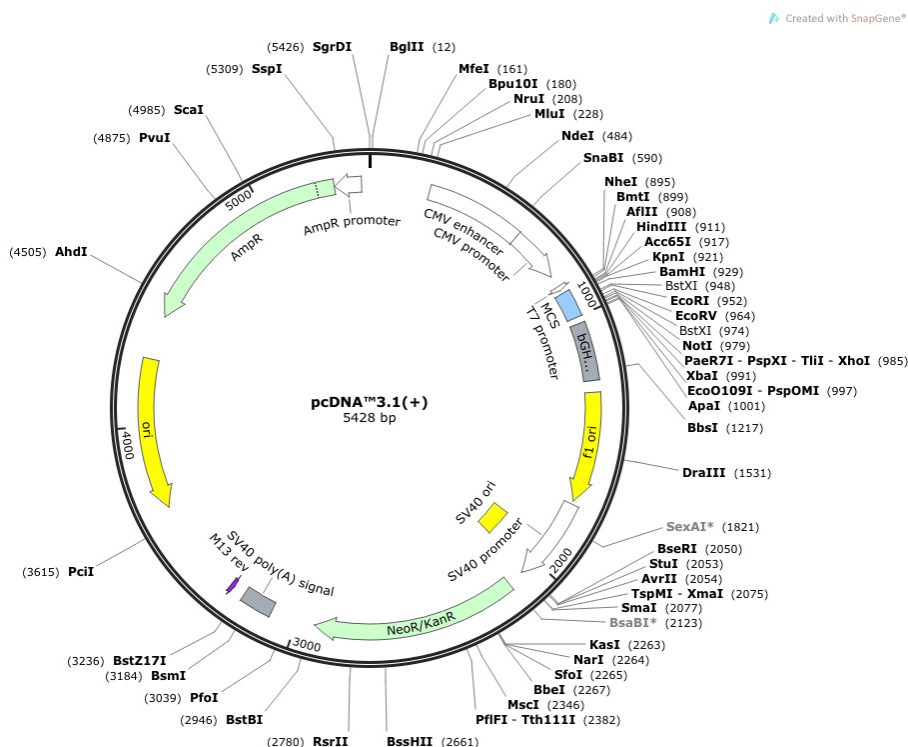


Abbildung 44: Plasmidkarte pcDNA3.1(+)-Neo (Invitrogen) Die Plasmidkarte wurde entnommen von der Homepage der Herstellers Invitrogen

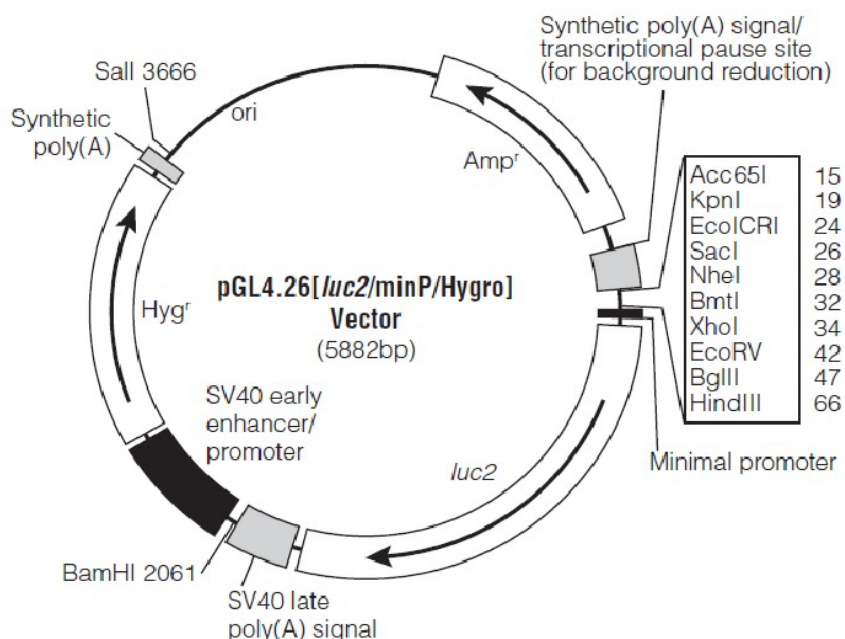


Abbildung 45: Plasmidkarte pGL4.26-luc (Promega) Die Plasmidkarte wurde entnommen von der Homepage des Herstellers Promega

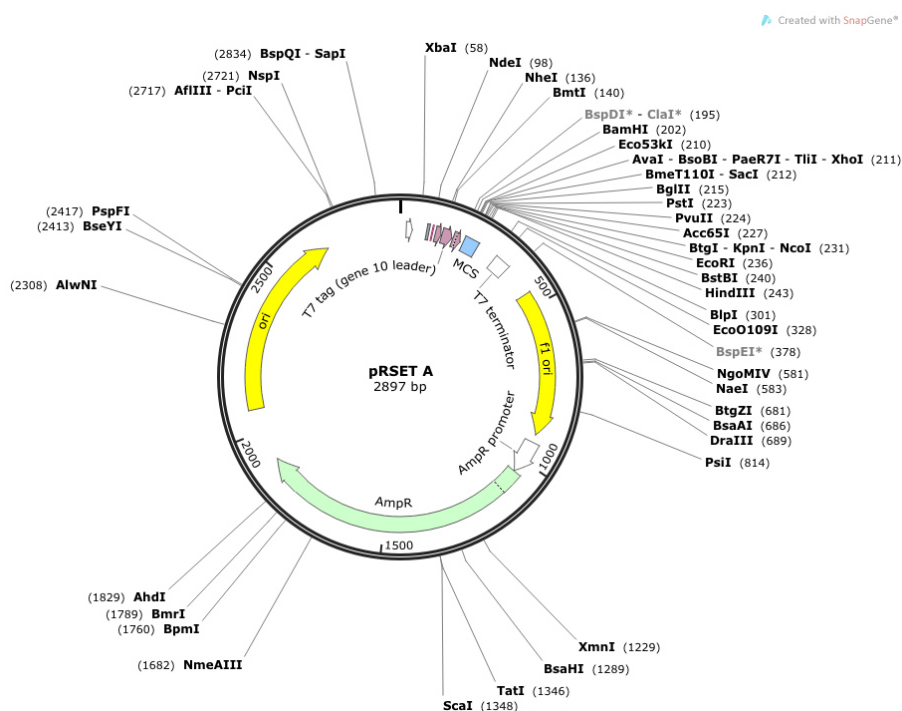
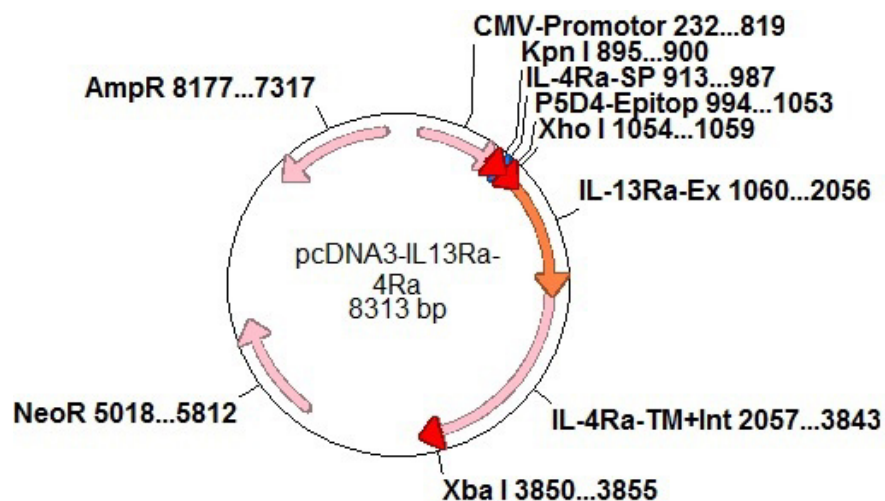
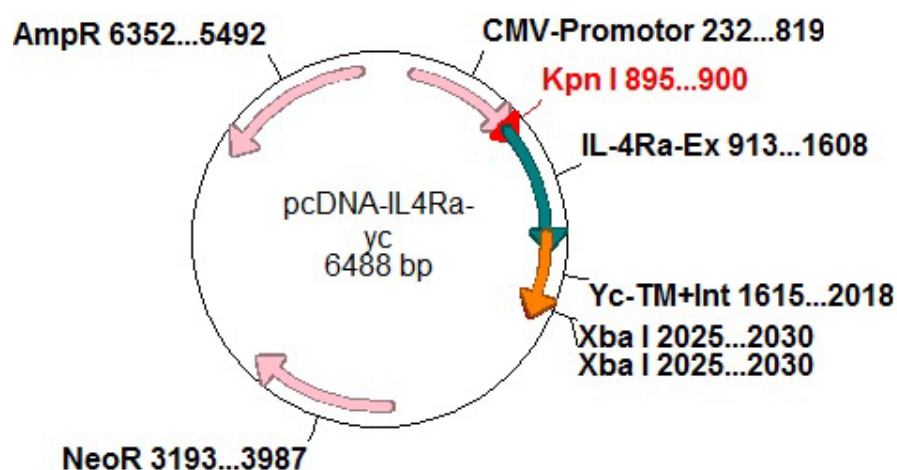


Abbildung 46: Plasmidkarte pRSet-5b (Invitrogen) Die Plasmidkarte wurde entnommen von der Homepage der Herstellers Invitrogen

Abbildung 47: Plasmidkarte pcDNA3.1-IL-13R α EX/IL-4R α IntAbbildung 48: Plasmidkarte pcDNA3.1-IL-4R α EX/ γ cInt

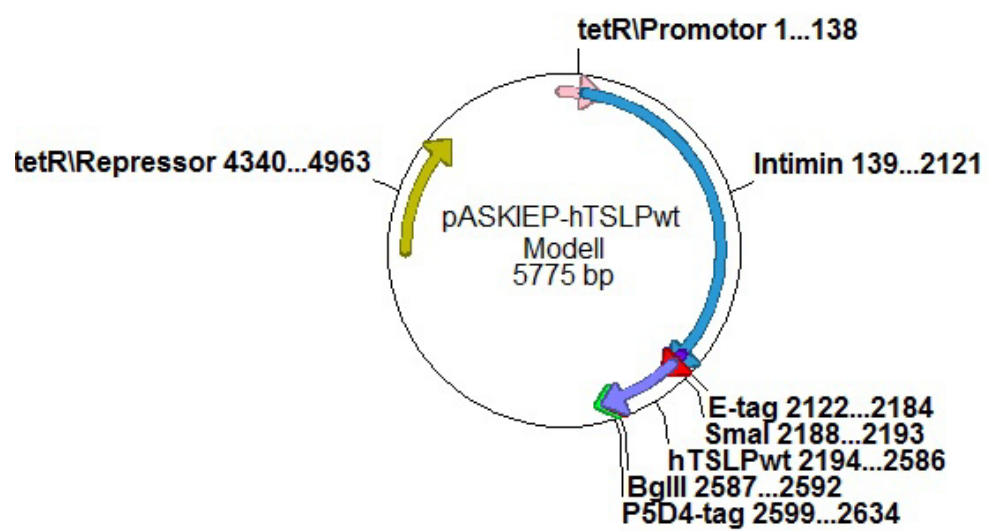


Abbildung 49: Plasmidkarte pASKIEP-TSLP

6.4 Abkürzungen

AD	Atopische Dermatitis
(B)-ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie (der B-Zellen)
APC	<i>allophycocyanin</i>
AS	Aminosäure
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BMP2	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>
Bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
c-fms	<i>Colony stimulating factor 1 receptor</i>
CRLF2	<i>Cytokine receptor-like factor 2</i>
DCs	<i>dendritic cells</i> / Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EC ₅₀ / IC ₅₀	halb-effektive / halb-inhibitorische Konzentration
ELISA	<i>Enzym-linked Immunosorbent Assay</i>
EPO	<i>Erythropoeitin</i>
EGF(R)	<i>Epithelial growth factor (receptor)</i>
Ex	extrazellulär
FACS	<i>Fluorescent-activated Cell Sorting</i>
fl	<i>fulllength</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FKS	Fötales Kälberserum
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
h / m / eq	Speziesangaben (h-human / m-murin / eq-equin)
HLPC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxydase</i>
Hyb	Hybrid
IFN _γ	Interferon γ
IRF1	<i>Interferon regulatory factor 1</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinasen
kDa	kilo Dalton
KO	<i>Knock-Out</i>
Int	intrazellulär
Luc	Luciferase
M-CSF	<i>Macrophage-colony stimulating factor</i>

mAb	<i>Monoclonal antibody</i> / monoklonaler Antikörper
MACS	<i>Magnetic-activated Cell Sorting</i>
moDCs	Monozyten-abgeleitete Dendritische Zelle
Mut	mutiert / Mutation / Mutante
NF κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NGF β B	<i>Nerve growth factor βB</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600nm
OVA	Ovalbumin
OX40L	OX40-Ligand
PCR	<i>Poly chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
pI	isoelektrischer Punkt
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
Rpm	rounds per minute (Umdrehung / Minute)
RT	Raumtemperatur
RFG	RPMI+FKS+Gentamycin
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SOCS	<i>supressor of Cytokine signaling</i>
SP	Signalpeptid
STAT	<i>Signaltransducers and activators of Signaling</i> / Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
TGF β	<i>Transforming Growth factor β</i>
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TPO	Thrombopoeitin
Tregs	regulatorische T-Zellen
TSLP	Thymic Stromal Lympopoeitin
TSLPR α	Thymic Stromal Lympopoeitin Rezeptor α -Kette
wt	Wildtyp

6.5 Lebenslauf

Name	Andreas Wohlmann
Anschrift	Otto-Schott-Strasse 1 07745 Jena
Geburtsdatum und -ort	24. März 1983 in Gera
Familienstand	ledig

Schulbildung und Studium

1989 - 1993	Talschule Jena
1993 - 2001	Gymnasium Am Anger Jena
06/2001	Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Am Anger in Jena
2001/02	Zivildienst Kindertagesstätte ,Anne Frank' in Jena
WS 2002/03	Studium der Biomedizintechnik an der Fachhochschule Jena
10/2003 – 02/2009	Studium der Pharma-Biotechnologie an der Fachhochschule Jena
18.02.2009	Diplomverteidigung

Berufliche Tätigkeiten

11.11. – 20.12.02	Studentische Hilfskraft Firma SIRS-Lab GmbH Jena
15.01. – 31.07.03	Studentische Hilfskraft Firma SIRS-Lab GmbH Jena
01.09.07 – 28.02.08	Praxissemester Institut für Biochemie II, Universitätsklinikum Jena, AG Signaltransduktion
01.03.08 – 28.02.09	Diplomsemester Institut für Biochemie II, Universitätsklinikum Jena, AG Signaltransduktion
01.03.09 – 30.04.11	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Institut für Biochemie II, Universitätsklinikum Jena, AG Signaltransduktion
01.05.11 – 31.10.12	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Firma Immunotools GmbH, Rostock
01.11.12 – 31.05.14	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Institut für Biochemie II, Universitätsklinikum Jena, AG Signaltransduktion

Seit 13.01.2011

Doktorand an der TU Darmstadt, Fachbereich Chemie,
Allgemeine Biochemie, Prof. Harald Kolmar

Publikationen

A. Wohlmann, K. Sebastian, A. Borowski, S. Krause, and K. Friedrich. Signal transduction by the atopy-associated human Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) receptor depends on Janus kinase function. *Biol Chem*, 391(2-3):181_6, 2010.

A. Borowski, T. Vetter, M. Kuepper, **A. Wohlmann**, S. Krause, T. Lorenzen, J. C. Virchow, W. Luttmann, and K. Friedrich. Expression analysis and specific blockade of the receptor for human Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) by novel antibodies to the human TSLPRa receptor chain. *Cytokine*, 61(2):546_55, 2013.

6.6 Förderungen

Die vorgelegte Arbeit wurde finanziert aus Mitteln des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE).

- Projekt-Nr. 2008 FE 9034, Verbund-Nr. 2008 VF 0010
- Projekt-Nr. 2011 FE 9053, Verbund-Nr. 2008 VF 0017
- V220-630-08-TFMV-1-VB052

6.7 Danksagung

Die angefertigte Arbeit wurde zum größten Teil in dem Institut für Biochemie II am Universitätsklinikum Jena angefertigt. Bei allen Wegbegleitern und Unterstützern dieser Arbeit möchte ich mich herzlichst bedanken.

Prof. Dr. Karlheinz Friedrich als Leiter der Arbeitsgruppe Signaltransduktion gebührt mein größter Dank. Schon während des Studiums, in der Phase der Diplomarbeit und besonders im Rahmen der Promotionsarbeit hat er mich fachlich unterstützt, Vertrauen in mich gesetzt und stand mir immer mit Rat und Inspiration zur Seite. Er vermittelte und prägte in mir maßgeblich die Grundsätze wissenschaftlichen Arbeitens und Schreibens, die mich in meiner weiteren beruflichen Laufbahn begleiten werden.

Die Betreuung der Promotion erfolgte durch Prof. Dr. Harald Kolmar von der Technischen Universität Darmstadt. Bei ihm möchte ich mich für das Vertrauen bedanken, was er in mich gelegt hat, als er mir die Durchführung einer Promotion in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Bei PD Dr. Werner Luttmann möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung in schwierigen Zeiten bedanken, die es mir ermöglicht hat, die Arbeit ohne Druck in den Laboren in Rostock weiterführen zu können.

Seiner Firma Immunotools GmbH sowie der Firma Invigate GmbH danke ich für die umfangreiche Zuverfügungstellung von Materialien, insbesondere Antikörper und Zytokine. Ohne diese wäre die Arbeit in dem Umfang nicht möglich gewesen.

Ich danke den Mitarbeitern der Firma Invigate GmbH für das Wissen über die rekombinante Herstellung von Proteinen, den Mitarbeitern der Universität Rostock, insbesondere Dr. Michael Küpper, für die Einführung in die Generierung von Antikörpern, den Mitarbeitern der Universitätsmedizin Mainz, insbesondere PD Dr. Stephan Gehring, für die Einblicke in die Arbeit mit Dendritischen Zellen.

Das Wichtigste zum Durchführen einer solch langen Arbeit ist eine gute Arbeitsatmosphäre im Labor. Diese wurde mir geschaffen durch viele Kollegen in Jena und Rostock, die zahlreich gekommen und gegangen sind, ihnen gilt mein Dank dafür. Besonderer Dank gilt dabei den langjährigen Begleitern Nadine, Susi, Matthias, Boro und Sebastian. Die Gespräche mit ihnen, der fachliche Austausch, die guten Tipps, Ratschläge und Ideen ermöglichten nicht nur einmal den Fortgang der Projekte. Sebastian gilt dabei ganz besonderer Dank dafür, trotz seiner eigenen Projekte immer ein offenes Ohr gehabt zu haben.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden bedanken, welche mich ausserhalb des Labors unterstützt haben. Besonderen Dank möchte ich dabei David, Elli und Krissie aussprechen, die mich besonders in schweren Zeiten des Zweifels aufgebaut haben.

Nicht zuletzt gilt der Dank meinen Eltern und meiner Familie, die mich auf unterschiedlichsten Ebenen unterstützt und mich stets voller Vertrauen in meine Wege bis hierher begleitet haben.

6.8 Selbständigkeitserklärung

Andreas Wohlmann
Otto-Schott-Str.1
07747 Jena

Datum
25. April 2014

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Weiterhin erkläre ich, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

Unterschrift